



**Rola FKBP2 w fałdowaniu proinsuliny i powstawaniu komórek β trzustki
zróżnicowanych z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych**

Edyta Urbaniak

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem Prof. UAM dr hab. Małgorzaty Borowiak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Szkoła Doktorska Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Laboratorium Komórek Macierzystych

Poznań, 2025



**The role of FKBP2 in proinsulin folding and differentiation of pancreatic
 β -cells from human pluripotent stem cells**

Edyta Urbaniak

Doctoral thesis prepared under the supervision of AMU Prof. dr hab. Małgorzata Borowiak

Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

Faculty of Biology

Doctoral School of Natural Sciences

Institute of Molecular Biology and Biotechnology

Laboratory of Stem Cells

Poznan, 2025

1. Spis treści/ Table of contents

1. Spis treści/ Table of contents	2
2. Streszczenie	3
Abstract	5
3. Prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	6
Research articles included in the dissertation	6
4. Lista skrótów/ List of abbreviations	7
5. Wstęp	11
Introduction	21
6. Cele i założenia badawcze	29
Research goals and hypotheses	30
7. Założenia badawcze i ich charakterystyka	31
Research assumptions and their characteristics	36
8. Najważniejsze ustalenia rozprawy doktorskiej	41
The most important findings of the doctoral dissertation	56
9. Dyskusja	69
Discussion	73
10. Wnioski	76
Conclusions	77
11. Oświadczenia doktoranta o wkładzie w powstanie/publikacji	78
Authorship statements of PhD candidate	81
12. Oświadczenia współautorów o wkładzie w powstanie publikacji	84
Authorship statements of co-authors of the article	98
13. Finansowanie	112
Funding	112
14. Publikacje niezwiązane z tematyką rozprawy, stanowiące część dorobku naukowego	113
Research articles not related to the topic of the dissertation, constituting a part of scientific portfolio	113
15. Podziękowania	114
Acknowledgements	114
16. Referencje/References	115
17. Załączniki/Attachments	120

2. Streszczenie

Cukrzyca stanowi jedno z największych wyzwań zdrowotnych współczesności, a jej przebieg związany jest z postępującą dysfunkcją i utratą komórek β trzustki. Prawidłowe funkcjonowanie tych komórek zależy od zdolności do intensywnej syntezy i wydzielania insuliny, co wymaga sprawnych mechanizmów fałdowania proinsuliny. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają molekularne chaperony i izomerazy peptydylo-prolilowe, w tym peptydylo-prolyl cis-trans izomeraza 2 (FKBP2). Celem niniejszej rozprawy było zbadanie roli *FKBP2* w procesie różnicowania i powstawaniu ludzkich komórek β *in vitro*, z wykorzystaniem pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *human pluripotent stem cells*, hPSC). Postawiono hipotezę, że białko FKBP2 uczestniczy w prawidłowym fałdowaniu proinsuliny, a jego brak prowadzi do aktywacji stresu retikulum endoplazmatycznego (ER), zaburzeń homeostazy wapniowej oraz zmian w różnicowaniu w kierunku komórek β . W pracy opracowano trzy modele hPSC: 1) z delecją genu *FKBP2* (ang. *FKBP2* knockout, KO), 2) z jego nadekspresją (ang. *FKBP2* gene overexpression, OE) oraz 3) z indukowaną delecją genu (ang. *FKBP2* induced knockout, iKO). Hodowla hPSC była różnicowana w kierunku komórek β i analizowana z wykorzystaniem szeregu technik, włączając w to immunofluorescencję, western blot, mikroskopię ze strukturalnym oświetleniem i elektronową, testy sekrecji insuliny, pomiary stężenia wapnia oraz sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek (ang. *single cell RNA-sequencing*, scRNA-seq). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że brak *FKBP2* prowadzi do spadku syntezy insuliny przy zachowanej produkcji proinsuliny, akumulacji C-peptydu, zaburzeń morfologii ziarnistości wydzielniczych oraz zmian w poziomie białek uczestniczących w powstawaniu komórek β . Równocześnie obserwowano aktywację stresu ER oraz spadek syntezy białka SERCA2, co skutkowało zaburzoną homeostazą wapniową. Analizy scRNA-seq ujawniły aktywację szlaku NFAT2–HDAC9, prowadzącą do zmiany fenotypu w kierunku komórek α trzustki. Interwencja farmakologiczna hamująca funkcję HDAC9 częściowo przywróciła syntezę insuliny i znacząco spowolniła proces różnicowania w stronę komórek α . Uzyskane wyniki wskazują, że FKBP2 pełni wieloaspektową rolę w komórkach β – działa jako białko opiekuńcze wspomagające fałdowanie proinsuliny, jako regulator odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej (ER) i modulator homeostazy wapniowej oraz jako czynnik stabilizujący „tożsamość” komórek β . Jego brak inicjuje kaskadę zaburzeń molekularnych prowadzących do utraty funkcjonalności i przeprogramowania procesu różnicowania w kierunku komórek α . Wyniki te sugerują, że FKBP2 może być potencjalnym biomarkerem

funkcji i wydajności procesu różnicowania komórek β z hPSC, co jest istotne dla terapii komórkowych i interwencji farmakologicznych ukierunkowanych na poprawę powstawania i funkcjonowania komórek β w cukrzycy.

Abstract

Diabetes presents a significant health challenge today, primarily linked to the progressive dysfunction and loss of pancreatic β -cells. The effective functioning of these cells relies on their ability to quickly synthesize and secrete insulin, which hinges on the proper mechanisms for proinsulin folding. In this regard, molecular chaperones and peptidyl-prolyl isomerases, particularly peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2 (FKBP2), are crucial. This dissertation aims to explore the role of FKBP2 in the differentiation and formation of human β -cells *in vitro*, leveraging human pluripotent stem cells (hPSCs). It is believed that FKBP2 plays a crucial role in ensuring proinsulin folds correctly, and its absence triggers endoplasmic reticulum (ER) stress, disrupts calcium homeostasis, and affects the differentiation process towards β -cells. To investigate this, three hPSC models were established: 1) a model with the *FKBP2* gene deleted (knockout, KO), 2) a model with *FKBP2* overexpression (OE) and 3) a model with an induced knockout of the gene (iKO). The cell cultures were directed toward β -cells and assessed through a diverse range of techniques, including immunofluorescence, Western blotting, structured illumination microscopy, electron microscopy, insulin secretion assays, calcium measurements, and single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq). The findings indicated that FKBP2 deficiency results in reduced insulin synthesis while maintaining proinsulin production. This was accompanied by C-peptide buildup, changes in secretory granule structure, and diminished expression of β -cell maturation markers. At the same time, there was evidence of ER stress activation and lower levels of SERCA2 protein, which led to disrupted calcium balance. Further scRNA-seq analysis uncovered activation of the NFAT2-HDAC9 pathway, suggesting a transition toward a pancreatic α -cell phenotype. Pharmacological intervention that inhibits HDAC9 function has been shown to partially restore insulin synthesis and notably slow the differentiation process toward α -cells. This highlights the multifaceted role of FKBP2 in β -cells: it serves as a chaperone for proinsulin folding, regulates the endoplasmic reticulum (ER) stress response, modulates calcium homeostasis, and stabilizes β -cell identity. When FKBP2 is absent, it triggers a cascade of molecular disruptions that result in a loss of functionality and a shift in the differentiation process toward α -cells (cellular reprogramming). These findings suggest that FKBP2 could be a valuable biomarker for assessing the function and efficiency of β -cell differentiation from hPSCs, which is crucial for advancing cell therapies and pharmacological strategies aimed at enhancing β -cell formation and function in diabetes.

3. Prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

- 1) Jedrzejak AP*, **Urbaniak EK***, Wasko JA*, Ziojla N, Borowiak M. Diabetes and SARS-CoV-2-Is There a Mutual Connection? *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 13;10:913305. doi: 10.3389/fcell.2022.913305. PMID: 35769263; PMCID: PMC9234398. * - **Autorzy równorzędni** (Praca przeglądowa).
- 2) **Urbaniak E**, Henry S, Lalowski M, Borowiak M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Feb 20;13:1502469. doi: 10.3389/fcell.2025.1502469. PMID: 40052150; PMCID: PMC11882602 (Praca przeglądowa).
- 3) **Urbaniak E**, Baginska M, Szlachcic WJ, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec MT, and Borowiak M. *bioRxiv* 2025. ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9. doi: 10.1101/2025.09.01.672695 (Praca oryginalna).

Research articles included in the dissertation

- 1) Jedrzejak AP*, **Urbaniak EK***, Wasko JA*, Ziojla N, Borowiak M. Diabetes and SARS-CoV-2-Is There a Mutual Connection? *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 13;10:913305. doi: 10.3389/fcell.2022.913305. PMID: 35769263; PMCID: PMC9234398. * - **First co-authors** (Review article).
- 2) **Urbaniak E**, Henry S, Lalowski M, Borowiak M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Feb 20;13:1502469. doi: 10.3389/fcell.2025.1502469. PMID: 40052150; PMCID: PMC11882602 (Review article).
- 3) **Urbaniak E**, Baginska M, Szlachcic WJ, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec MT, and Borowiak M. *bioRxiv* 2025. ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9. doi: 10.1101/2025.09.01.672695 (Original article).

4. Lista skrótów/ List of abbreviations

4-PBA – Kwas 4-fenylomasłowy / 4-Phenylbutyric Acid

AA – Aktywina A / Activin A

ACE2 – Enzym konwertujący angiotensynę 2 / Angiotensin-Converting Enzyme 2

ALK5 (Alk5i II) – Kinaza receptorowa aktywiny typu 5 / Activin Receptor-Like Kinase 5

ARX – Czynn timeranskrypcyjny homeobiałkowy ARX / Aristaless Related Homeobox

ATF4 – Aktywujący czynnik transkrypcyjny 4 / Activating Transcription Factor 4

ATF6 – Aktywujący czynnik transkrypcyjny 6 / Activating Transcription Factor 6

BC – Betacelulina / Betacellulin

BiP (HSPA5, GRP78) – Białko wiążące immunoglobulinę / Binding Immunoglobulin Protein / Glucose-Regulated Protein 78, Heat Shock Protein Family A Member 5

BMP – Białko morfogenetyczne kości / Bone Morphogenetic Protein

CALR – Kalretikulina / Calreticulin

Ca²⁺ – Jon wapnia / Calcium ion

c-MYC (MYC) – Protoonkogen c-MYC / v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

CCL2 (MCP-1) – Chemokina ligand 2 / Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

CCL3, CCL4, CCL8 – Chemokiny CCL3, CCL4, CCL8 / Chemokines CCL3, CCL4, CCL8

CHGA – Chromogranina A / Chromogranin A

CHIR – CHIR99021 (inhibitor kinazy syntazy glikogenu-3 beta, GSK-3β) / CHIR99021 (inhibitor of glycogen-3 beta kinase synthase, GSK-3β)

CHOP (DDIT3, GADD153) – Białko homologiczne C/EBP / C/EBP Homologous Protein

Cn – Kalcyneuryna / Calcineurin

CPE – Karboksypeptydaza E / Carboxypeptidase E

C-PEP – Peptyd C / C-peptide

CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL10, CXCL11 – Chemokiny CXC / CXC Chemokines

DE – Endoderma definitywna (ostateczna) / Definitive Endoderm

DKA – Cukrzycowa kwasica ketonowa / Diabetic Ketoacidosis

DPP4 (CD26) – Dipeptydylopeptydaza 4 / Dipeptidyl Peptidase 4

DTT – Ditiotreitól / Dithiothreitol

EGF – Naskórkowy czynnik wzrostu / Epidermal Growth Factor

EIF2α (eIF2α) – Czynn timerancjacji translacji 2α / Eukaryotic Translation Initiation Factor 2α

EP – Progenitory endokrynne / Endocrine Progenitors

ER – Siateczka śródplazmatyczna / Endoplasmic Reticulum

ERAD – Degradacja białek zależna od ER / ER-Associated Degradation

ERO1 (ERO1 α , ERO1 β) – Oksydoreduktaza ER 1 / ER Oxidoreductin 1

ESCs – Embrionalne komórki macierzyste / Embryonic Stem Cells

FGF – Czynn timer wzrostu fibroblastów / Fibroblast Growth Factor

FKBP2 – peptydylo-prolyl cis-trans izomeraza 2 (Białko wiążące FK506 2) / peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2 (FK506 Binding Protein 2)

FOXA2 – Forkhead box A2 / Forkhead Box A2

GCG – Glukagon / Glucagon

GLUT2 (SLC2A2) – Transporter glukozy typu 2 / Glucose Transporter Type 2

GO – Ontologia genów / Gene Ontology

GPX – Peroksydaza glutationowa / Glutathione Peroxidase

GPX7 – Peroksydaza glutationowa 7 / Glutathione Peroxidase 7

GRP78 (BiP, HSPA5) – Białko regulowane glukożą 78 / Glucose-Regulated Protein 78

GRP94 (HSP90B1) – Białko regulowane glukożą 94 / Glucose-Regulated Protein 94 (Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1)

GWAS – Badania asocjacyjne całego genomu/ Genome-wide association studies

H₂O₂ – Nadtlenek wodoru / Hydrogen Peroxide

HDAC9 – Deacetylaza histonowa 9 / Histone Deacetylase 9

HNF1 β – Czynn timer transkrypcyjny jądrowy hepatocytów 1 β / Hepatocyte Nuclear Factor 1 Beta

hPSCs – Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste / Human Pluripotent Stem Cells

HUES8-iCas9 – Linia ludzkich embrionalnych komórek macierzystych *HUES8* z wprowadzonym indukowalnym systemem *Cas9* (CRISPR-Cas9) / *HUES8 human embryonic stem cell line carrying an inducible Cas9* (CRISPR-Cas9) system

ICAM1 (CD54) – Częściczka adhezji międzykomórkowej 1 / Intercellular Adhesion Molecule 1

IDF – Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna / International Diabetes Federation

IF – Immunofluorescencja / Immunofluorescence

IL1B – Interleukina 1B / Interleukin 1B

IL1RN – Antagonista receptora interleukiny 1 / Interleukin 1 Receptor Antagonist

INS – Insulina / Insulin

INSM1 – Białko związane z insulinoma 1 / Insulinoma-Associated 1

iKO – Indukowana delecja genu (Indukowany knockout) / Inducible Knockout

IP-MS – Immunoprecypitacja sprzężona ze spektrometrią mas / Immunoprecipitation–Mass Spectrometry

iPSCs – Indukowalne pluripotencjalne komórki macierzyste / Induced Pluripotent Stem Cells

IRE1 (ERN1) – Kinaza serynowo-treoninowa/endonukleaza IRE1 / Inositol-Requiring Enzyme 1

KLF4 – Czynn timeranskrypcyjny Krüppela 4 / Krüppel-like Factor 4

KO – Komórki z delecją genu / Knockout

LDN – LDN193189 (inhibitor BMP) / LDN193189 (BMP inhibitor)

MAMs – Błony ER związane z mitochondriami / Mitochondria-associated membranes

MAFA – Czynn timeranskrypcyjny MAFA / v-maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A

MCP-1 – Białko chemotaktyczne monocytów-1 / *monocyte chemoattractant protein-1*

MIDY – Cukrzyca młodzieńcza indukowana mutacją genu insuliny / Mutant INS-gene-induced Diabetes of Youth

MODY – Cukrzyca monogenowa dorosłych / Maturity Onset Diabetes of the Young

NGN3 (NEUROG3) – Neurogenina 3 / Neurogenin 3

Nodal – Nodal (ligand z rodziny TGF- β) / Nodal (TGF- β family ligand)

NFAT2 (NFATC1) – Czynn timeranskrypcyjny jądrowy aktywowanych limfocytów T 2 / Nuclear Factor of Activated T-cells 2

NKX2.2 – Czynn timeranskrypcyjny z rodziny homeobox NK2 / NK2 Homeobox 2

NKX6.1 – Czynn timeranskrypcyjny z rodziny homeobox NK6 / NK6 Homeobox 1

NRP1 – Neuropilina 1 / Neuropilin 1

OCT4 (POU5F1, OCT3/4) – Czynn timeranskrypcyjny wiążący oktamer 4 / Octamer-Binding Transcription Factor 4

OE – Nadekspresja genu / Gene overexpression

PAX6 – Homeobiałko PAX6 / Paired Box 6

PC1/3 (PCSK1) – Konwertaza proproteinowa 1/3 / Proprotein Convertase 1/3

PC2 (PCSK2) – Konwertaza proproteinowa 2 / Proprotein Convertase 2

PCW – Tydzień po zapłodnieniu / Post-Conception Week

PDX1 – Czynn timeranskrypcyjny trzustkowo-dwunastniczy 1 / Pancreatic and Duodenal Homeobox 1

PDI (P4HB) – Izomeraza dwusiarczkowa białek / Protein Disulfide Isomerase

PdBu – 12,13-dwumaślan forbolu / Phorbol 12,13-dibutyrate

PERK (EIF2AK3, PKR-like ER kinase) – Kinaza białkowa podobna do PKR związana z ER/ Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (Pancreatic eIF2 α Kinase)

PKC – Kinaza białkowa C / Protein Kinase C

PKR (EIF2AK2) – Kinaza białkowa R / Protein Kinase R

PMID – Identyfikator w bazie PubMed / PubMed Identifier

PP – Progenitory trzustkowe / Pancreatic Progenitors

PPIazy (PPIase) – Izomerazy peptydylo-prolilowe / Peptidyl-Prolyl Isomerases

PIIB (Cyclophilin B) – Peptydylo-prolyl izomeraza B / Peptidyl-Prolyl Isomerase B

PRDX4 – Peroksyredoksyna 4 / Peroxiredoxin 4

PTD – Polskie Towarzystwo Diabetologiczne / Polish Diabetes Association

RA – Kwas retinowy / Retinoic Acid

S1 – Sant-1 (inhibitor szlaku Hedgehog) / Hedgehog pathway inhibitor

scRNA-seq – Sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek / Single-cell RNA sequencing

SIM – Mikroskopia ze strukturalnym oświetleniem / Structured illumination microscopy

SLC – Rodzina transporterów rozpuszczalników / Solute Carrier Family

SOX2 – Czynn timeranskrypcyjny SRY-podobny 2 / SRY-box Transcription Factor 2

SOX17 – Czynn timeranskrypcyjny SRY-podobny 17 / SRY-box Transcription Factor 17

T1D – Cukrzyca typu 1 / Type 1 Diabetes

T2D – Cukrzyca typu 2 / Type 2 Diabetes

T3 – Trójjodotyronina / Triiodothyronine

TEM – Transmisyjna mikroskopia elektronowa / Transmission Electron Microscopy

TMPRSS2 – Transbłonowa proteaza serynowa 2 / Transmembrane Serine Protease 2

TUDCA – Kwas tauroursodeoksycholowy / Tauroursodeoxycholic Acid

UPR – Odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka/ Unfolded Protein Response

Wnt – Szlak sygnałowy Wnt / Wnt Signaling Pathway (Wingless-related intergration site)

WT – Typ dziki / Wild Type

XBP1 – Białko wiążące X-box 1 / X-Box Binding Protein 1

5. Wstęp

Cukrzyca (łac. *diabetes mellitus*) to grupa przewlekłych chorób metabolicznych, których wspólną cechą jest hiperglikemia, czyli podwyższone stężenie glukozy we krwi, wynikające z defektów w wydzielaniu lub działaniu insuliny – hormonu kluczowego dla metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek. Jedynym znaczącym źródłem insuliny w organizmie są komórki typu β w trzustce. Wyróżnia się kilka podstawowych typów cukrzycy, z których najczęstsze to cukrzyca typu 1 (ang. *type 1 diabetes*, T1D) oraz cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes*, T2D) ¹. T1D ma charakter autoimmunologiczny i zwykle ujawnia się w wieku dziecięcym lub młodzieńczym. Charakteryzuje się całkowitym zniszczeniem komórek β trzustki, prowadzącym do bezwzględnej niedoboru insuliny. Leczenie tej postaci cukrzycy opiera się na podawaniu insuliny egzogennej. Z kolei T2D rozwija się najczęściej u osób dorosłych i wynika z postępującej insulinooporności, czyli zmniejszonej wrażliwości tkanek na insulinę, połączonej z upośledzoną funkcją wydzielniczą komórek β trzustki ^{2,3}. T2D stanowi zdecydowaną większość przypadków cukrzycy – według danych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD), odpowiada za około 90% wszystkich zachorowań ⁴. Istnieją także inne, rzadsze formy cukrzycy, takie jak cukrzyca monogenowa (np. *Maturity Onset Diabetes of the Young*, MODY), cukrzyca wtórna (np. w przebiegu chorób trzustki lub przy stosowaniu niektórych leków), a także cukrzyca ciążowa, pojawiająca się w czasie ciąży i zwiększająca ryzyko rozwoju T2D w późniejszym okresie życia. Skala problemu cukrzycy w Polsce rośnie w alarmującym tempie. Szacuje się, że choroba ta dotyka już ponad 3 miliony Polaków, z czego nawet u 1 miliona osób może pozostawać niezdiagnozowana ⁵. Wśród wszystkich postaci cukrzycy to właśnie T2D stanowi obecnie największe wyzwanie zdrowotne zarówno w Polsce, jak i na świecie. Według szacunków Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (ang. *International Diabetes Federation*, IDF), do roku 2045 liczba chorych z T2D może przekroczyć 780 milionów na świecie, co odzwierciedla zarówno rosnący wpływ czynników środowiskowych, jak i indywidualnych predyspozycji genetycznych ⁶. W warunkach fizjologicznych komórki β trzustki są zdolne do dynamicznej regulacji wydzielania insuliny, odpowiadając na zmiany stężenia glukozy we krwi. W przebiegu T2D początkowy etap kompensacyjnej hiperinsulinemii przechodzi w fazę dekompensacji, podczas której komórki β nie są już w stanie utrzymać odpowiedniego poziomu sekrecji insuliny. Prowadzi to do progresji hiperglikemii i pojawienia się pierwszych widocznych objawów klinicznych choroby. Przy znacznym niedoborze lub braku insuliny w celu produkcji energii dochodzi do spalania tłuszczów zamiast glukozy, co

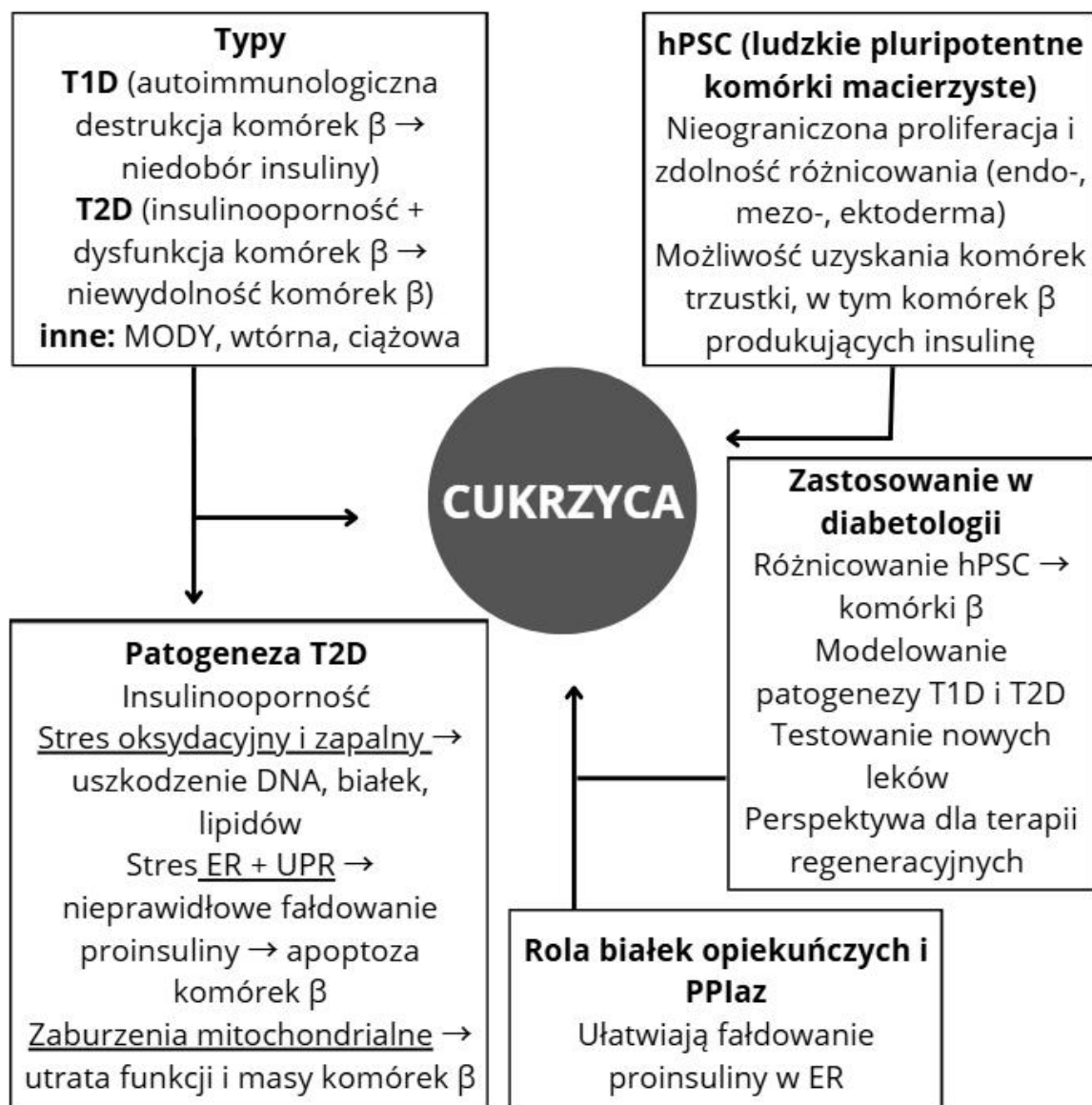
prowadzi do nadmiernej produkcji ciał ketonowych wywołujących kwasicę metaboliczną, do których zalicza się m.in. cukrzycową kwasicę ketonową (DKA) ⁷.

W przeciwieństwie do T1D, T2D nie wynika z autoimmunologicznego procesu niszczenia wysp trzustkowych, lecz ze stopniowej utraty funkcji i masy komórek β – zjawiska określanego jako „ β -cell failure”. W patogenezie tego procesu kluczową rolę odgrywają czynniki środowiskowe, zaburzenia mitochondrialne oraz deregulacja systemów odpowiedzialnych za homeostazę białek (proteostazę) ^{8,9}. Na poziomie molekularnym T2D powiązana jest z kilkoma kluczowymi mechanizmami molekularnymi, m. in. insulinoopornością w tkankach obwodowych (która wywołuje wzrost zapotrzebowania na insulinę), stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym prowadzącym do uszkodzenia DNA, białek i lipidów w komórkach β ¹⁰, zaburzeniami homeostazy ER i aktywacją zbiorczej odpowiedzi komórek na nieprawidłowo sfałdowane białka (ang. *unfolded protein response*, UPR). W warunkach przewlekłych może skutkować to apoptozą komórek β ¹¹, zwiększoną akumulacją nieprawidłowo sfałdowanej proinsuliny, co w konsekwencji zaburza zdolność do produkcji i sekrecji aktywnej, prawidłowo pofałdowanej insuliny.

Badania wskazują, że nieprawidłowości w procesie fałdowania insuliny mogą być jednym z pierwszych sygnałów upośledzonej funkcji komórek β w T2D ¹². W tym kontekście coraz większe zainteresowanie budzą białka opiekuńcze (molekularne chaperony) i peptydyloprolyl cis-trans izomerazy (PPIazy, immunofiliny), enzymy które uczestniczą w procesie fałdowania proinsuliny oraz zapobiegają jej agregacji w ER, gdzie katalizują inwersję wiązania peptydowego pomiędzy resztą proliny a poprzedzającym ją aminokwasem, zmieniając jego konformację z *cis* na *trans* i odwrotnie ¹³. Zrozumienie mechanizmów molekularnych prowadzących do zaburzenia funkcji komórek β jest kluczowe nie tylko dla rozwoju nowych terapii, ale także dla poprawy skuteczności strategii regeneracyjnych w cukrzycy.

Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. human pluripotent stem cells, hPSC) stanowią ważne narzędzie badawcze w biologii rozwoju, fizjologii komórkowej oraz medycynie regeneracyjnej. Dzięki zdolności do różnicowania się we wszystkie typy komórek somatycznych, hPSC umożliwiają zarówno odtworzenie w warunkach *in vitro* głównych etapów embriogenezy, jak i uzyskanie dojrzałych, funkcjonalnych fenotypów komórek ludzkiego organizmu ¹⁴. Komórki te mogą być pochodzenia embrionalnego (ang. *embryonic*

stem cells, ESC), uzyskiwane z blastocysty lub podlegać indukcji (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPSC), tj. powstawać poprzez reprogramowanie komórek somatycznych do stanu pluripotencji, na przykład w wyniku ekspresji czynników Yamanaki: czynnika oktamerowego 4 (ang. *octamer-binding transcription factor 4*, OCT4), czynnika SRY-podobnego 2 (ang. *SRY-box transcription factor 2*, SOX2), czynnika Krüppela 4 (ang. *Krüppel-like factor 4*, KLF4) i czynnika transkrypcyjnego c-MYC (ang. *avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*, c-MYC) ¹⁵. Zarówno komórki ESC, jak i iPSC wykazują zdolność do nieograniczonej proliferacji *in vitro* oraz do różnicowania w komórki mezodermalne, endodermalne i ektodermalne, co czyni je wszechstronnym modelem badawczym ¹⁶. Właściwości te umożliwiają nie tylko prowadzenie badań podstawowych nad mechanizmami różnicowania i rozwoju człowieka, ale również tworzenie modeli chorób, badania toksykologiczne oraz opracowywanie nowoczesnych terapii komórkowych i genowych ¹⁷. Modele różnicowania hPSC do funkcjonalnie dojrzałych komórek trzustki stanowią obecnie jedno z najbardziej obiecujących narzędzi do badania patogenezы cukrzycy oraz testowania nowych podejść farmakologicznych ^{18,19}. W tym aspekcie, jednym z najbardziej obiecujących zastosowań hPSC jest tworzenie komórek wydzielniczych (endokrynnych) trzustki, a zwłaszcza produkujących insulinę komórek β , ze względu na ich kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy glukozy. Co więcej, komórki te są głównym celem destrukcji autoimmunologicznej w T1D oraz źródłem dysfunkcji w T2D ²⁰ (**Rycina 1**).

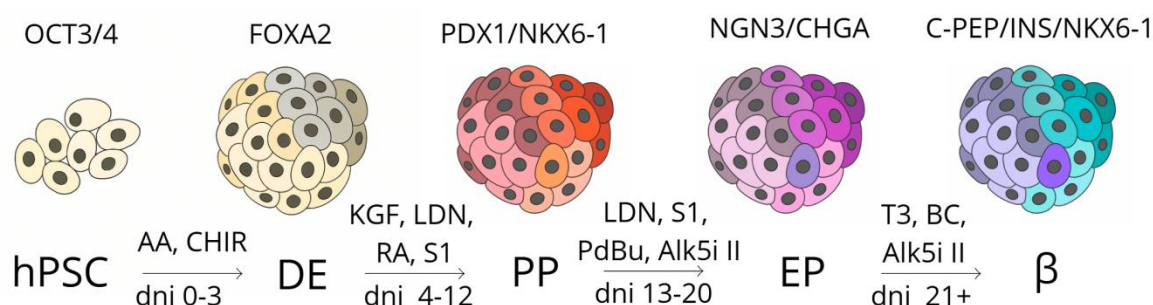


Rycina 1. Schematyczne ujęcie wybranych aspektów patogenezy i terapii cukrzycy.

W centrum diagramu znajduje się pojęcie „cukrzyca”, wokół którego przedstawiono kluczowe zagadnienia: **Typy cukrzycy** – obejmujące T1D (autoimmunologiczne zniszczenie komórek β prowadzące do bezwzględnego niedoboru insuliny), T2D (insulinooporność połączona z dysfunkcją komórek β , tzw. β -cell failure) oraz inne, rzadsze postaci (MODY, wtórna, ciążowa). **Patogeneza T2D** – mechanizmy molekularne obejmujące insulinooporność, stres oksydacyjny i zapalny uszkadzający DNA, białka i lipidy, zaburzenia fałdowania białek w siateczce śródplazmatycznej (stres ER stres, aktywacja UPR) skutkujące apoptozą komórek β , a także dysfunkcję mitochondrialną prowadzącą do utraty ich masy i funkcji. **Rola białek opiekuńczych i PPIaz** – które wspomagają prawidłowe fałdowanie proinsuliny w siateczce śródplazmatycznej, stanowiąc potencjalny cel interwencji terapeutycznych. **hPSC (ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste)** – charakteryzujące się nieograniczoną proliferacją i zdolnością do różnicowania w trzy listki zarodkowe, z możliwością uzyskania komórek trzustki, w tym komórek β produkujących insulinę. **Zastosowania w diabetologii** – obejmujące różnicowanie hPSCs do komórek β , modelowanie patogenezy T1D i T2D, badania nad mechanizmami dysfunkcji komórek β , testowanie nowych leków oraz rozwój

strategii terapii regeneracyjnych. Diagram ukazuje złożoność procesów leżących u podstaw cukrzycy typu 2 oraz podkreśla potencjał wykorzystania hPSCs jako innowacyjnego narzędzia badawczego i terapeutycznego.

Różnicowanie hPSCs do komórek β obejmuje kilka etapów naśladujących rozwój zarodkowy i proces embriogenezy. Proces ten rozpoczyna się od indukcji endodermy ostatecznej (zwanej również definitywną, ang. *definitive endoderm*, DE), po której następuje formowanie endodermy przedtrzustkowej (tworzącej zawiązki trzustki), w której aktywacja czynnika transkrypcyjnego trzustkowo-dwunastniczego 1 (ang. *pancreatic and duodenal homeobox 1*, PDX1) oraz wątrobowego czynnika transkrypcyjnego 1 β (ang. *hepatocyte nuclear factor 1 beta*, HNF1 β) określa tożsamość komórek trzustki. Kolejne etapy to różnicowanie do progenitorów trzustkowych (ang. *pancreatic progenitors*, PP), następnie progenitorów endokrynnych (ang. *endocrine progenitors*, EP) aż po finalne powstawanie dojrzałych komórek β (**Rycina 2**)^{20,21}.



Rycina 2. Schemat przedstawia protokół różnicowania *in vitro* ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (hPSC) do komórek β trzustki.

Poszczególne stadia procesu różnicowania charakteryzują się obecnością specyficznych markerów: OCT3/4 dla komórek pluripotencjalnych (hPSC), FOXA2 dla endodermy ostatecznej (DE), PDX1 i NKX6-1 dla progenitorów trzustkowych (PP), NGN3 i CHGA dla progenitorów endokrynnych (EP) oraz NKX6-1, insulina (INS) i C-PEP dla dojrzałych komórek β . Na schemacie przedstawiono również czynniki używane do różnicowania, które – poprzez aktywację bądź hamowanie określonych szlaków sygnałowych – warunkują przejście komórek do kolejnych etapów: AA – Aktywina A, aktywująca szlak TGF- β (ang. *Activin A*), CHIR – CHIR99021, inhibitor kinazy GSK3 β , prowadzący do aktywacji szlaku Wntless-related intergration site (Wnt), KGF – Czynn timerostu keratynocytów (ang. *Keratinocyte Growth Factor*), LDN – LDN193189, inhibitor szlaku BMP (ang. *Bone Morphogenetic Protein*), RA – Kwas retinowy, aktywujący szlak receptorów kwasu retinowego (ang. *Retinoic Acid*), S1 – inhibitor szlaku Hedgehog (Sant-1), PdBu – 12,13-dwumaślan forbolu (ang. *Phorbol 12,13-dibutyrate*), aktywator PKC (ang. *Protein Kinase C*), Alk5i II – ALK5 inhibitor II, Inhibitor receptora ALK5, T3 – Trójjodotyronina (ang. *Triiodothyronine*), działająca poprzez szlak receptorów hormonów tarczycy, BC – Betacelulina (ang. *Betacellulin*), czynnik wzrostu aktywujący szlak EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*). Na schemacie dodatkowo zaznaczono czas (w dniach) potrzebny do przejścia komórek na kolejne stadium różnicowania.

Każdy z wymienionych etapów wymaga precyzyjnej regulacji szlaków sygnałowych, takich jak Nodal, białko morfogenetyczne kości (ang. *bone morphogenetic protein*, BMP), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF) czy szlak sygnałowy Wnt (ang. *Wingless-related intergration site*, Wnt) a także kontroli ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych, m.in. czynnika SRY-podobnego 17 (ang. *SRY-box transcription factor 17*, SOX17), czynnika forkhead A2 (ang. *forkhead box A2*, FOXA2), czynnika transkrypcyjnego trzustkowo-dwunastniczego 1 (ang. *pancreatic and duodenal homeobox 1*, PDX1), czynnika transkrypcyjnego z rodziny homeobox NK6 (ang. *NK6 homeobox 1*, NKX6.1), neurogeniny 3 (ang. *neurogenin 3*, NGN3), insuliny (ang. *insulin*, INS) oraz homologa onkogenu mięsakowego v-Maf typu A (ang. *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*, MAFA)^{20,22}.

Szczególną rolę odgrywa ekspresja genu *NGN3*, który pełni funkcję „przełącznika” kierującego komórki w stronę fenotypu endokrynnego. Aktywacja *NGN3* uruchamia sieć czynników transkrypcyjnych obejmującą m.in. *NKX2.2* (ang. *NK2 homeobox 2*), *PAX6* (ang. *paired box 6*), białko związane z insulinoma 1 (ang. *Insulinoma-Associated 1*, *INSM1*) co pośrednio prowadzi do aktywacji genu *INS* i ostatecznie do powstania funkcjonalnych komórek β zdolnych do wydzielania insuliny^{23,24}.

Pomimo istotnych postępów w optymalizacji protokołów różnicowania, do uzyskania dojrzałych komórek β zdolnych do wydzielania insuliny w sposób zależny od glukozy niezbędne jest pełniejsze zrozumienie procesów molekularnych determinujących ich funkcjonalność^{14,20}. Zachowanie cech charakterystycznych oraz pełnej funkcjonalności komórek β uzyskanych *in vitro* wymaga nie tylko precyzyjnego sterowania procesem różnicowania, ale także zapewnienia im sprawnych mechanizmów utrzymania homeostazy białek. W tym kontekście, coraz więcej danych wskazuje, że dojrzewanie funkcjonalne komórek β nie zależy wyłącznie od aktywności programów transkrypcyjnych, ale również od równowagi pomiędzy sygnalizacją wapniową a mechanizmami epigenetycznej kontroli genów^{25,26}. Czynniki transkrypcyjne z rodziny NFAT, takie jak NFAT2 (inaczej NFATC1; ang. *nuclear factor of activated T-cells 2*) aktywowany w odpowiedzi na wzrost stężenia Ca^{2+} i działanie kalcyneuryny (ang. *calcineurin*, Cn) – regulują ekspresję genów istotnych dla funkcji komórek β , w tym związanych z sekrecją insuliny i komunikacją międzykomórkową, a doniesienia sugerują, że mogą również modulować geny biorące udział w ich dojrzewaniu^{27,28}. Efektywność działania NFAT2 zależy jednak od odpowiedniej dostępności

chromatyny, co czyni go podatnym na wpływ mechanizmów epigenetycznych. W tym kontekście szczególne znaczenie ma deacetylaza histonowa 9 (ang. *histone deacetylase 9*, HDAC9), której nadmierna aktywność może ograniczać możliwość wiązania NFAT2 z sekwencjami regulatorowymi genów docelowych, potencjalnie tłumiąc jego korzystne efekty.

Represyjna aktywność HDAC9 może natomiast ograniczać dojrzewanie i funkcjonalność tych komórek ²⁹. Nadmierna aktywacja histonowych deacetylaz klasy IIa, w tym HDAC9, może prowadzić do represji genów kluczowych dla tożsamości komórkowej, a w konsekwencji do jej utraty ²⁹. HDAC9 działa jako epigenetyczny represor transkrypcji, deacetylujący histony i ograniczający dostępność chromatyny dla czynników aktywujących ²⁹. Co istotne, badania wykazały, że **farmakologiczne zahamowanie deacetylazy HDAC9 prowadzi do zwiększenia liczby dojrzałych i funkcjonalnych komórek β , co sugeruje, że jej aktywność stanowi przeszkodę w ich pełnym różnicowaniu w kierunku komórek β** ³⁰. W tym kontekście równowaga w aktywności aktywatorów transkrypcyjnych, takich jak NFAT2, a represorami epigenetycznymi, takimi jak HDAC9, wydaje się kluczowa dla uzyskania w pełni funkcjonalnych komórek β .

Jednym z najbardziej krytycznych aspektów funkcji komórek β jest ich **zdolność do syntezy, fałdowania i wydzielania dużych ilości insuliny** – hormonu białkowego produkowanego w postaci preproinsuliny i dojrzewającego w ER oraz aparacie Golgiego. Wysoka aktywność biosyntetyczna sprawia, że komórki β są szczególnie podatne na zakłócenia w systemie proteostazy, a więc zestawie mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowe fałdowanie, modyfikację potranslacyjną, transport i degradację białek. W tym kontekście produkcja hormonu białkowego insuliny stanowi jeden z najbardziej wymagających procesów biosyntezy białek. Jest ona procesem wysoce zorganizowanym i zależnym od prawidłowego funkcjonowania systemu proteostazy komórkowej i ER. Kluczową rolę w tym systemie odgrywają białka opiekuńcze (tzw. chaperony molekularne), które wspomagają prawidłowe fałdowanie substratów białkowych, zapobiegają ich agregacji i kierują nieprawidłowo sfałdowane białka do degradacji ⁸. Proinsulina, jako forma prekursorowa, syntetyzowana jest na rybosomach związanych z ER, gdzie ulega fałdowaniu z wykorzystaniem chaperonów molekularnych, takich jak białko wiążące immunoglobulinu BiP (ang. *Binding immunoglobulin protein*, zwane także jako 78 kDa białko regulowane glukozą, *glucose-regulated protein 78 kDa*, GRP78), kalneksyny (ang. *calnexin*, CNX), kalretikuliny (ang. *calreticulin*, CARL) oraz białek z rodziny PDI (**opisane szczegółowo w Publikacji 2**).

Do utworzenia poprawnej struktury proinsuliny, krytyczne jest tworzenie mostków dwusiarczkowych między resztami cysteiny, co determinuje stabilność jej konformacji oraz możliwość dalszej obróbki proteolitycznej w aparacie Golgiego ^{31,32}.

Wysokie zapotrzebowanie na insulinę, wynikające z insulinooporności, często przekracza zdolności komórek β do prawidłowego fałdowania proinsuliny w ER, co prowadzi do jej nieprawidłowego przetwarzania i potencjalnie do apoptozy komórek β . W sytuacjach przewlekłego przeciążenia syntetycznego, takich jak w T2D, ER nie nadąża z poprawnym składaniem nowo syntetyzowanych białek. W rezultacie dochodzi do gromadzenia niefunkcjonalnych form proinsuliny, co wyzwała reakcje obronne komórki i ostatecznie może prowadzić do jej śmierci – nawet niezależnie od klasycznej odpowiedzi na stres ER. Zrozumienie szczegółowych etapów fałdowania proinsuliny i identyfikacja kluczowych białek uczestniczących w tym procesie jest kluczowe dla poznania patofizjologii T2D oraz opracowania nowych strategii terapeutycznych ^{12,33,34}. Fałdowanie proinsuliny to skomplikowany proces obejmujący tworzenie mostków dwusiarczkowych z pomocą białek opiekuńczych oraz przejścia konformacyjne, które umożliwiają przekształcenie liniowego łańcucha aminokwasów w funkcjonalną strukturę przestrzenną. Wszystkie te etapy muszą być precyzyjnie zsynchronizowane, a ich prawidłowy przebieg zależy od obecności zarówno białek opiekuńczych, jak i wyspecjalizowanych enzymów. Niewielkie odchylenia w konformacji lub zakłócenie dynamiki fałdowania mogą skutkować powstawaniem nieprawidłowych form nieaktywnych biologicznie. Jednym z krytycznych momentów w tym procesie jest izomeryzacja reszt proliny, która jako jedyny aminokwas może występować w konformacjach *cis* i *trans*. To właśnie zmiana konformacji wokół wiązania peptydowego X-Pro decyduje o lokalnej strukturze białka i jego dalszym składaniu. Ponieważ spontaniczna izomeryzacja jest procesem powolny i termodynamicznie ograniczony, komórka wykorzystuje izomerazy peptydylo-prolilowe, aby utrzymać tempo syntezy białek zgodne z potrzebami metabolicznymi. Obecność proliny będącej w niewłaściwej konformacji przestrzennej może prowadzić do spowolnienia/inhibicji procesu fałdowania i akumulacji źle sfałdowanego białka. W kontekście proinsuliny oznacza to realne ryzyko zatrzymania jej dojrzewania i nieprawidłowego sortowania w aparacie sekrecyjnym. Zamiast aktywnego hormonu, powstają wtedy nieprawidłowe agregaty, które przeciążają system kontroli jakości ER ³⁴.

W ER zachodzą złożone procesy fałdowania białek sekrecyjnych, obejmujące tworzenie mostków dwusiarczkowych, izomeryzację wiązań peptydylo-prolinowych, glikozylację oraz formowanie struktury trzeciorzędowej. Zaburzenia w którymkolwiek z tych etapów prowadzą do akumulacji źle sfałdowanych białek i aktywacji szlaku UPR ³⁵, który pełni funkcję adaptacyjną, zwiększając syntezę białek opiekuńczych i komponentów systemu degradacyjnego komórki ³⁶. Aktywacja UPR uruchamia szereg mechanizmów adaptacyjnych mających na celu przywrócenie homeostazy. Aktywowane zostają trzy główne szlaki: enzym wymagający inozytolu 1 (ang. *inositol requiring enzyme 1*, IRE1), kinaza PERK (ang. *PKR-like ER kinase*, zwana też EIF2AK3) oraz aktywujący czynnik transkrypcyjny 6 (ang. *activating transcription factor 6*, ATF6), które prowadzą do zwiększenia syntezy białek opiekuńczych, zmniejszenia translacji białek oraz nasilenia procesy degradacji białek zależnej od retikulum endoplazmatycznego (ang. *ER-associated degradation*, ERAD). Jednak przewlekła aktywacja UPR, zamiast działań adaptacyjnych, inicjuje ścieżki prowadzące do apoptozy komórek. W kontekście komórek β , przewlekły stres ER uznaje się za jeden z kluczowych mechanizmów prowadzących do ich dysfunkcji oraz utraty, co obserwowane jest w T2D ⁸. Wśród molekularnych chaperonów obecnych w ER szczególne miejsce zajmują izomerazy peptydylo-prolinowe. Jedną z rodzin PPIaz są białka wiążące FK506 (ang. *FK506-binding proteins*, FKBP) – białka te zostały pierwotnie zidentyfikowane jako cząsteczki wiążące leki immunosupresyjne, takie jak takrolimus (znany również pod nazwą FK506), lecz wykazujące niezależne od farmakologii funkcje chaperonowe. Do tej rodziny należy **izomeraza peptydylo-prolyl cis-trans 2** (ang. *FKBP Prolyl Isomerase 2*, FKBP2) niewielkie białko o masie ok. 13 kDa, zakotwiczone w błonie siateczki śródplazmatycznej i zawierające pojedynczą domenę PPIazy ³⁷, co sugeruje jego potencjalną rolę w nadzorze nad fałdowaniem białek sekrecyjnych, w tym również proinsuliny ³⁸.

Funkcja biologiczna FKBP2 pozostaje stosunkowo słabo poznana. Dane proteomiczne i badania *in vitro* sugerują, że FKBP2 może uczestniczyć w fałdowaniu białek przeznaczonych do wydzielania, ustabilizować ich strukturę przestrzenną oraz zapobiegać agregacji ³⁸. Wysoką syntezę białka FKBP2 obserwowano w komórkach o intensywnej aktywności sekrecyjnej, takich jak komórki α czy komórki β , co sugeruje na potencjalne znaczenie białka w utrzymaniu proteostazy w środowisku silnego stresu ER ³⁸.

W kontekście różnicowania hPSC w kierunku komórek β , rola białka FKBP2 pozostaje nieznana. Biorąc pod uwagę, że powstawanie dojrzałej insuliny wymaga ścisłej regulacji na wielu etapach, w tym na etapie fałdowania proinsuliny w ER, zasadne jest postawienie hipotezy, że FKBP2 odgrywa kluczową funkcję pomocniczą w tym procesie. Zaburzenie funkcji genu *FKBP2* – poprzez jego wyciszenie, mutację lub delecję może prowadzić do nieprawidłowego fałdowania proinsuliny, aktywacji stresu ER, a w efekcie do dysfunkcji lub śmierci komórek β . Równocześnie, brak tego chaperonu podczas różnicowania hPSC mógłby skutkować powstaniem nie w pełni ukształtowanego fenotypu komórek zdolnych do wysokiej aktywności sekrecyjnej, ograniczając ich potencjał funkcjonalny i terapeutyczny.

Z punktu widzenia biologii rozwoju oraz zastosowań klinicznych, badania nad FKBP2 mogą dostarczyć ważnych informacji na temat molekularnych determinant funkcjonalnej dojrzałości komórek β . Znajomość czynników umożliwiających efektywne fałdowanie i wydzielanie białek w warunkach obciążenia ER może przyczynić się do udoskonalenia protokołów różnicowania hPSC oraz do opracowania strategii ochrony komórek β w kontekście chorób metabolicznych. W szerszym ujęciu, FKBP2 może stanowić potencjalny cel farmakologiczny w terapii T2D, w której deficyt proteostazy i przewlekły stres ER odgrywają kluczową rolę w progresji choroby. **Biorąc pod uwagę powyższe zagadnienia w niniejszej pracy doktorskiej skupiłam się na zbadaniu roli FKBP2 w komórkach β trzustki podczas ich różnicowania i w procesie dojrzewania insuliny.**

Introduction

Diabetes mellitus is a group of chronic metabolic diseases whose common feature is hyperglycemia, i.e., elevated blood glucose levels resulting from defects in the secretion or action of insulin, a hormone essential for the metabolism of carbohydrates, fats, and proteins. The only significant source of insulin in the body are the β -cells in the pancreas. There are several basic types of diabetes, the most common of which are type 1 diabetes (T1D) and type 2 diabetes (T2D) ¹. T1D is autoimmune in nature and usually manifests itself in childhood or adolescence. It is characterized by the complete destruction of pancreatic β -cells, leading to absolute insulin deficiency. Treatment of this form of diabetes is based solely on the administration of exogenous insulin. T2D, on the other hand, most often develops in adults and results from progressive insulin resistance, i.e., reduced tissue sensitivity to insulin, combined with impaired secretory function of pancreatic β -cells ^{2,3}. T2D accounts for the vast majority of diabetes cases – according to data from the Polish Diabetes Association (PTD), it accounts for approximately 90% of all cases ⁴. There are also other, rarer forms of diabetes, such as monogenic diabetes (e.g., Monogenic Diabetes of the Young, MODY), secondary diabetes (e.g., in the course of pancreatic diseases or when using certain medications), as well as gestational diabetes, which occurs during pregnancy and increases the risk of developing T2D in the future. The scale of the diabetes problem in Poland is growing at an alarming rate. It is estimated that the disease already affects over 3 million Poles, of whom up to 1 million may remain undiagnosed ⁵. Among all forms of diabetes, T2D currently poses the greatest health challenge both in Poland and worldwide. According to estimates by the International Diabetes Federation (IDF), by 2045 the number of people with T2D may exceed 780 million worldwide, reflecting both the growing influence of environmental factors and individual genetic predispositions ⁶. Under physiological conditions, pancreatic β -cells are capable of dynamically regulating insulin secretion in response to changes in blood glucose concentration. In the course of T2D, the initial stage of compensatory hyperinsulinemia progresses to a phase of decompensation, during which β -cells are no longer able to maintain adequate insulin secretion. This leads to the progression of hyperglycemia and the appearance of the first visible clinical symptoms of the disease. With a significant deficiency or lack of insulin for energy production, fats are burned instead of glucose, leading to excessive production of ketone bodies that cause metabolic acidosis, including diabetic ketoacidosis (DKA) ⁷.

Unlike T1D, T2D does not result from an autoimmune process destroying the pancreatic islets, but from a gradual loss of function and mass of β cells – a phenomenon known as “ β -cell failure.” Environmental factors, mitochondrial disorders, and dysregulation of the systems responsible for protein homeostasis (proteostasis) play a key role in the pathogenesis of this process ^{8,9}. At the molecular level, T2D is associated with several key molecular mechanisms, including insulin resistance in peripheral tissues (which causes an increase in insulin demand), oxidative stress and inflammation leading to damage to DNA, proteins, and lipids in β -cells ¹⁰, ER homeostasis disorders, and activation of the collective response of cells to misfolded proteins (unfolded protein response, UPR). Under chronic conditions, this can result in β -cell apoptosis ¹¹ and increased accumulation of misfolded proinsulin, which in turn impairs the ability to produce and secrete active, correctly folded insulin.

Studies indicate that abnormalities in the insulin folding process may be one of the first signs of impaired β -cell function in T2D ¹². In this context, increasing interest is being shown in molecular chaperones and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPIases, immunophilin), enzymes that participate in the folding of proinsulin and prevent its aggregation in the ER, where they catalyze the inversion of the peptide bond between proline and the residue of the adjacent amino acid, changing its conformation from *cis* to *trans* and vice versa) ¹³. Understanding the molecular mechanisms leading to β -cell dysfunction is crucial not only for the development of new therapies, but also for improving the effectiveness of regenerative strategies in diabetes.

Human pluripotent stem cells (hPSCs) are a powerful research tool in developmental biology, cellular physiology, and regenerative medicine. Thanks to their ability to differentiate into almost all types of somatic cells, hPSCs enable both the *in vitro* recreation of the main stages of embryogenesis and the production of mature, functional phenotypes of human cells ¹⁴. These cells can be of embryonic origin (embryonic stem cells, ESCs), obtained from a blastocyst, or induced (induced pluripotent stem cells, iPSCs), i.e., created by somatic cell reprogramming to a pluripotent state, for example, as a result of the ectopic expression of Yamanaka factors: octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), SRY-like factor 2 (SOX2), Krüppel factor 4 (KLF4) and c-MYC transcription factor (also called as avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-MYC) ¹⁵. Both ESCs and iPSCs show the ability to proliferate indefinitely *in vitro* and to differentiate into mesodermal, endodermal, and ectodermal cells, making them a versatile research model ¹⁶. These properties enable not

only basic research into the mechanisms of human differentiation and development, but also the creation of disease models, toxicological studies, and the development of modern cell and gene therapies ¹⁷. Models of hPSCs differentiation into functionally mature pancreatic cells are currently one of the most promising tools for studying the pathogenesis of diabetes and testing new pharmacological approaches ^{18,19}. In this regard, one of the most promising applications of hPSCs is the creation of pancreatic endocrine cells, particularly insulin-producing β -cells, due to their key role in maintaining glucose homeostasis. Furthermore, these cells are the main target of autoimmune destruction in T1D and the source of dysfunction in T2D ²⁰ (**Figure 1**).

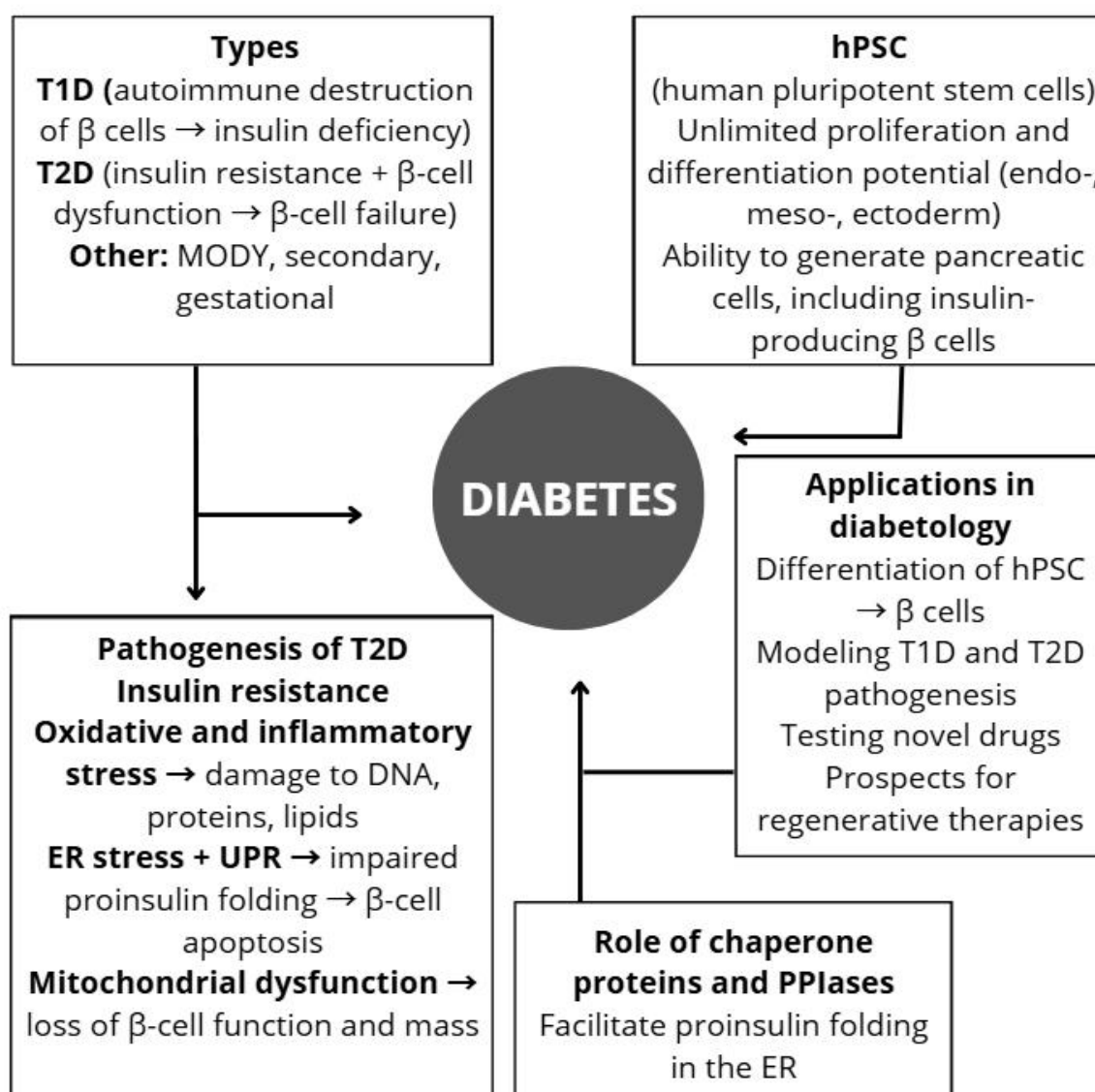


Figure 1. Schematic representation of selected aspects of diabetes pathogenesis and therapy.

At the center of the diagram is the concept of “Diabetes,” around which key issues are presented. Types of diabetes include T1D (autoimmune destruction of β -cells leading to absolute insulin

deficiency), T2D (insulin resistance combined with β -cell dysfunction, i.e., “ β -cell failure”), and other, less common forms (MODY, secondary, gestational). Pathogenesis of T2D encompasses molecular mechanisms such as insulin resistance, oxidative and inflammatory stress causing damage to DNA, proteins, and lipids, protein misfolding in the endoplasmic reticulum (ER stress, activation of the unfolded protein response, UPR) resulting in β -cell apoptosis, as well as mitochondrial dysfunction leading to the loss of β -cell mass and function. Role of chaperone proteins and PPIases – these facilitate proper folding of proinsulin in the endoplasmic reticulum and represent potential therapeutic targets. hPSCs (human pluripotent stem cells) are characterized by unlimited proliferation and the capacity to differentiate into the three germ layers, with the possibility of generating pancreatic cells, including insulin-producing β -cells. Applications in diabetology include differentiation of hPSCs into β -cells, modeling the pathogenesis of T1D and T2D, studies on mechanisms of β -cell dysfunction, testing of new drugs, and the development of regenerative therapy strategies. The diagram illustrates the complexity of processes underlying type 2 diabetes and highlights the potential of hPSCs as an innovative research and therapeutic tool.

The differentiation of hPSCs into β -cells involves several stages of embryonic development resembling the process of early embryogenesis: starting with the induction of definitive endoderm (DE), through the formation of the pre-pancreatic endoderm (forming the pancreas bud), in which the activation of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) and hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1 β) determines the identity of pancreatic cells, differentiation into pancreatic progenitors (PP), and then endocrine progenitors (EP) until the formation of mature β -cells, as shown in **Figure 2** ^{20,21}.

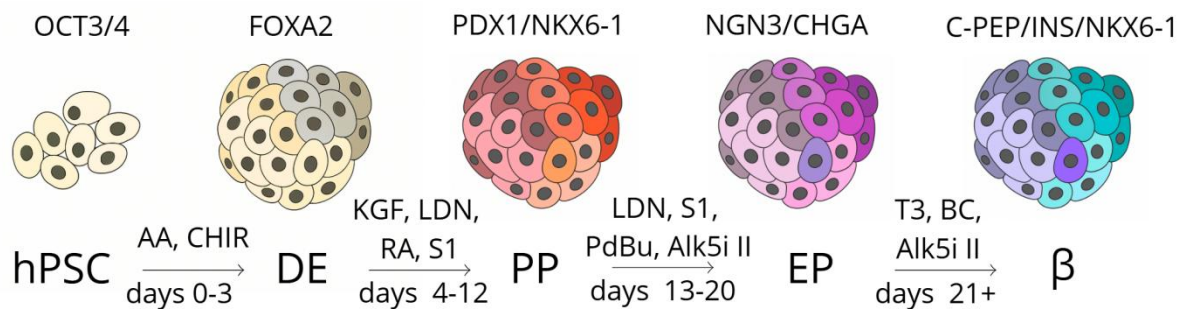


Figure 2. The scheme illustrates an *in vitro* differentiation protocol of human pluripotent stem cells (hPSC) into pancreatic β -cells. The individual stages of the differentiation process are characterized by the presence of specific markers: OCT3/4 for pluripotent cells (hPSCs), FOXA2 for definitive endoderm (DE), PDX1 and NKX6-1 for pancreatic progenitors (PP), NGN3 and CHGA for endocrine progenitors (EP), and NKX6-1, insulin (INS), and C-PEP for mature β cells. The diagram also shows sets of differentiation factors which, by activating or inhibiting specific signaling pathways, determine the transition of cells to subsequent stages: AA – Activin A, activating the TGF- β pathway, CHIR – CHIR99021, GSK3 β inhibitor, leading to the activation of the Wnt-related intergration site (Wnt) pathway, KGF – Keratinocyte Growth Factor, LDN – LDN193189, BMP (Bone Morphogenetic Protein) pathway inhibitor, RA – Retinoic acid, activating the retinoic acid receptor pathway, S1 – Hedgehog pathway inhibitor (Sant-1), PdBu – Phorbol 12,13-dibutyrate, PKC (Protein Kinase C) activator, Alk5i II – ALK5 inhibitor II, ALK5 receptor inhibitor, T3 –

Triiodothyronine, acting through the thyroid hormone receptor pathway, BC – Betacellulin, growth factor activating the EGF (Epidermal Growth Factor) pathway. The diagram also shows the time (in days) required for cells to progress to the next stage of differentiation.

Each of these stages requires precise regulation of signaling pathways such as Nodal, BMP (bone morphogenetic protein), FGF (fibroblast growth factor) or Wnt (Wingless-related intergration site), as well as control of the expression of key transcription factors, including SRY-box transcription factor 17 (SOX17), forkhead box A2 (FOXA2), pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1), NK6 homeobox 1 (NK6 homeobox 1, NKX6.1), neurogenin 3 (NGN3), insulin (INS), and v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA)^{20,22}.

The expression of the *NGN3* gene plays a special role, acting as a “switch” that directs cells towards the endocrine phenotype. Activation of NGN3 triggers a network of transcription factors including NKX2.2 (NK2 homeobox 2), PAX6 (paired box 6), insulinoma-associated protein 1 (INSM1), which indirectly leads to the activation of the *INS* gene and ultimately to the formation of functional β -cells capable of secreting insulin^{23,24}.

Despite significant progress in optimizing differentiation protocols, a more complete understanding of the molecular processes determining their functionality is necessary to obtain mature β -cells capable of glucose-dependent insulin secretion^{14,20}. Maintaining the characteristic features and full functionality of β -cells obtained *in vitro* requires not only precise control of the differentiation process but also ensuring efficient mechanisms for maintaining protein homeostasis. In this context, more and more data indicate that the functional maturation of β -cells does not depend solely on the activity of transcriptional programs, but also on the balance between calcium signaling and epigenetic gene control mechanisms^{25,26}. Transcription factors from the NFAT family, such as NFAT2 (also known as NFATC1; nuclear factor of activated T-cells 2) – activated in response to increased Ca^{2+} concentration and calcineurin (Cn) – regulate the expression of genes important for β -cell function, including those related to insulin secretion and intercellular communication, and reports suggest that they may also modulate genes involved in their maturation^{27,28}. However, the effectiveness of NFAT2 depends on the availability of chromatin, which makes it susceptible to epigenetic mechanisms. In this context, the histone deacetylase 9 (HDAC9) is particularly important, as its excessive activity may limit the ability of NFAT2 to bind to the regulatory sequences of target genes, potentially suppressing its beneficial effects.

Repressive HDAC9 activity, on the other hand, may limit the maturation and functionality of these cells ²⁹. Excessive activation of class IIa histone deacetylases, including HDAC9, can lead to the repression of these same genes and the loss of their cellular identity ²⁹. HDAC9 acts as an epigenetic repressor of transcription, deacetylating histones and limiting the availability of chromatin to activating factors ²⁹. Importantly, studies have shown that **pharmacological inhibition of HDAC9 leads to an increase in the number of mature and functional β -cells, suggesting that its activity is an obstacle to further differentiation towards β -cells** ³⁰. In this context, the balance between the activity of transcriptional activators, such as NFAT2, and epigenetic repressors, such as HDAC9, appears to be crucial for obtaining fully functional β -cells.

One of the most critical aspects of β -cell function is their **ability to synthesize, fold, and secrete large amounts of insulin**, a protein hormone produced in the form of proinsulin and matured in the ER and Golgi apparatus. High biosynthetic activity makes β -cells particularly susceptible to disruptions in the proteostasis system, i.e., the set of mechanisms responsible for the proper folding, post-translational modification, transport, and degradation of proteins. In this context, the production of the protein hormone insulin is one of the most demanding processes of protein biosynthesis. It is a highly organized process that depends on the proper functioning of the cellular proteostasis system and the ER. A key role in this system is played by chaperone proteins, which assist in the proper folding of protein substrates, prevent their aggregation, and direct misfolded proteins to degradation ⁸. Proinsulin, as a precursor form, is synthesized on ribosomes associated with the ER, where it undergoes folding with the help of molecular chaperones such as glucose-regulated protein 78 kDa, BiP (Binding immunoglobulin protein, also known as glucose-regulated protein 78 kDa, GRP78), calnexin (CNX), calreticulin (CARL) and proteins from the PDI family **(described in detail in article 2)**. The formation of disulfide bridges between cysteines is critical for the formation of the correct proinsulin structure, which determines the stability of its conformation and the possibility of further proteolytic processing in the Golgi apparatus ^{31,32}.

The high demand for insulin resulting from insulin resistance often exceeds the ability of β -cells to properly fold proinsulin in the ER, leading to its abnormal processing and potentially to β -cell apoptosis. In situations of chronic synthetic overload, such as in T2D, the ER cannot keep up with the correct folding of newly synthesized proteins. As a result, non-functional

forms of proinsulin accumulate, triggering the cell's defense responses and ultimately leading to its death, even independently of the classic ER stress response. Understanding the detailed stages of proinsulin folding and identifying the key proteins involved in this process is crucial for understanding the pathophysiology of T2D and developing new therapeutic strategies^{12,33,34}. Proinsulin folding is a complex process involving the formation of disulfide bridges with the help of chaperone proteins and conformational structural transitions that enable the transformation of a linear amino acid chain into a functional spatial structure. All these steps must be precisely synchronized, and their correct execution depends on the presence of both chaperone proteins and specialized catalytic enzymes. Slight deviations in conformation or disruption of folding dynamics can result in the formation of abnormal forms that are not biologically active. One of the critical moments in this process is the isomerization of proline residues, which is the only amino acid that can occur in *cis* and *trans* conformations. It is the change in conformation around the X-Pro peptide bond that determines the local structure of the protein and its further folding. Since this process is slow and thermodynamically limited, the cell needs peptidyl-prolyl isomerases to maintain the rate of protein synthesis in line with metabolic needs. The presence of proline in the wrong spatial conformation can lead to a slowdown/inhibition of the folding process and the accumulation of misfolded protein. In the context of proinsulin, this means a real risk of its maturation being halted and incorrect sorting in the secretory apparatus. Instead of an active hormone, abnormal aggregates are formed, which overload the ER quality control system³⁴.

Complex processes of secretory protein folding occur in the ER, including the formation of disulfide bridges, isomerization of peptidyl-prolyl bonds, glycosylation, and tertiary structure formation. Disruptions in any of these stages lead to the accumulation of misfolded proteins and activation of the UPR³⁵, which performs an adaptive function, increasing the synthesis of chaperone proteins and components of the cell degradation system³⁶. Activation of the UPR triggers a series of adaptive mechanisms aimed at restoring homeostasis. Three main pathways are activated: inositol requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK also known as EIF2AK3) and activating transcription factor 6 (ATF6), which lead to increased synthesis of protective proteins, reduced protein translation, and intensification of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway (ER-associated degradation, ERAD). However, chronic activation of the UPR, rather than adaptive responses, initiates pathways leading to cell apoptosis. In β -cells, chronic ER stress and abnormal proinsulin folding are associated with the development and progression of T2D. In the context of β -cells, chronic

ER stress is considered one of the key mechanisms leading to their dysfunction and loss, which is observed in T2D ⁸. Among the molecular chaperones present in the ER, peptidyl-proline isomerases occupy a special place. One family of PPIases are FK506-binding proteins (FKBP) – these proteins were originally identified as molecules binding immunosuppressive drugs such as tacrolimus (also known as FK506), but they also exhibit important chaperone functions independent of their pharmacological action. This family includes **peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2 (FKBP2)**, a small protein with a mass of approximately 13 kDa, anchored in the endoplasmic reticulum membrane and containing a single PPIase domain ³⁷, suggesting its potential role in supervising the folding of secretory proteins, including proinsulin ³⁸.

The biological function of FKBP2 remains relatively poorly understood. Proteomic data and *in vitro* studies suggest that FKBP2 may participate in the folding of proteins destined for secretion, stabilize their spatial structure, and prevent aggregation ³⁸. High synthesis of FKBP2 protein has been observed in cells with intense secretory activity, such as α -cells and β -cells, suggesting the potential importance of the protein in maintaining proteostasis in an environment of severe ER stress ³⁸.

In the context of hPSC differentiation towards β -cells, the role of FKBP2 protein remains unknown. Given that the formation of mature insulin requires strict regulation at multiple stages, including the folding of proinsulin in the ER, it is reasonable to hypothesize that FKBP2 plays a key auxiliary role in this process. Disruption of *FKBP2* gene function—through silencing, mutation, or deletion—may lead to abnormal proinsulin folding, activation of ER stress, and ultimately to β -cell dysfunction or death. At the same time, the absence of this chaperone during hPSC differentiation could result in the formation of an incompletely formed phenotype of cells capable of high secretory activity, limiting their functional and therapeutic potential.

From the perspective of developmental biology and clinical applications, research on FKBP2 may provide important information on the molecular determinants of functional maturity of β - cells. Knowledge of the factors enabling effective protein folding and secretion under ER stress conditions may contribute to the improvement of hPSC differentiation protocols and the development of strategies for protecting β -cells in the context of metabolic diseases. More broadly, FKBP2 may be a potential pharmacological target in T2D therapy, where proteostasis deficiency and chronic ER stress play a key role in disease progression. **With**

these questions in mind, my doctoral thesis focused on investigating the role of FKBP2 in pancreatic β -cells during their differentiation and in the process of insulin maturation.

6. Cele i założenia badawcze

Celem niniejszej dysertacji było zrozumienie roli białka FKBP2 w procesach różnicowania w warunkach *in vitro* oraz zbadanie jego roli w prawidłowym powstawaniu insuliny z wykorzystaniem hPSCs. Przeprowadzone badania skupiły się na dwóch kluczowych aspektach:

- 1) Funkcji FKBP2 jako białka opiekuńczego w ER, odpowiedzialnego za prawidłowe fałdowanie proinsuliny,
- 2) Potencjalnej roli FKBP2 w różnicowaniu komórek oraz regulacji ich tożsamości w trakcie tego procesu.

Postawiono następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza 1: FKBP2 uczestniczy w prawidłowym fałdowaniu proinsuliny w ER. Brak tego białka skutkuje aktywacją UPR, oraz prowadzi do niewydolności wydzielniczej komórek β ,

Hipoteza 2: FKBP2 odgrywa rolę regulatora rozwoju komórek endokrynnych; delecja genu *FKBP2* zaburza różnicowanie,

Hipoteza 3: Efekty rozwojowe i strukturalno-funkcjonalne wynikające z wycięcia genu *FKBP2* mogą być od siebie niezależne i możliwe do rozdzielenia w czasie po zastosowaniu modelu komórkowego z indukowalnym wyłączeniem genu.

Research goals and hypotheses

The aim of this dissertation was to understand the role of FKBP2 protein in differentiation processes *in vitro* and to examine its role in the proper processing of insulin using hPSCs.

The study zeroed in on two primary areas:

- 3) **Investigating FKBP2's function as a chaperone protein in the ER, which is crucial for ensuring proper proinsulin folding,**
- 4) **The potential role of FKBP2 in differentiation and regulation of their affiliation to a specific cell type during differentiation.**

To guide the research, the following hypotheses were proposed:

Hypothesis 1: FKBP2 is critical for the proper folding of proinsulin within the ER. Its absence triggers the activation of UPR and ultimately leads to exocrine β -cell dysfunction,

Hypothesis 2: FKBP2 plays a role in regulating endocrine cell development; deletion of the FKBP2 gene disrupts differentiation,

Hypothesis 3: The effects on development and structure-function resulting from the knockout of the *FKBP2* gene may occur independently and can be differentiated over time following the use of a cellular model with an induced gene knockout.

7. Założenia badawcze i ich charakterystyka

1) Opracowanie i validacja modelu komórek hPSC z całkowitą delecją genu *FKBP2* (ang. *FKBP2* knockout, KO).

W celu uzyskania modelu komórek z delecją genu *FKBP2* wykorzystano system CRISPR/Cas9 z zaprojektowanymi sgRNA skierowanymi na egzony 1, 2 i 6 genu *FKBP2*. hPSC (HUES8-iCas9) poddano lipofekcji, wprowadzając konstrukt z sgRNA, a następnie wyizolowano pojedyncze klony komórkowe w warunkach hodowli adherentnej. Genotypowanie klonów prowadzono z użyciem techniki PCR, a obecność delecji w genie *FKBP2* potwierdzono metodą sekwencjonowania Sangera. W wyselekcjonowanych klonalnych liniach hPSC, zróżnicowanych w kierunku komórek β , brak syntezy białka FKBP2 potwierdzono za pomocą western blot oraz immunofluorescencji. Do dalszych badań wybrano dwie z jedenastu otrzymanych linii KO, które charakteryzowały się spójnym fenotypem podczas różnicowania.

2) Opracowanie i validacja modelu z nadekspresją genu *FKBP2* (ang. *FKBP2* overexpression, OE).

Model z nadekspresją genu *FKBP2* opracowano z użyciem wektora plazmidowego opartego na systemie PiggyBac i Tet-On, do którego wprowadzono sekwencję kodującą FKBP2 połączoną ze znacznikiem FLAG. Plazmid wprowadzono do komórek hPSC metodą lipofekcji, a następnie przeprowadzono selekcję linii komórkowych z wykorzystaniem puromycyny. W uzyskanych liniach ekspresję genu *FKBP2* indukowano przez dodanie do pożywki doksycykliny w stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$, co pozwoliło na czasową i kontrolowaną aktywację transgenu. Poziom syntezy białka FKBP2 oceniano za pomocą western blot i immunofluorescencji. W ten sposób uzyskano model umożliwiający analizę efektów zwiększonej syntezy FKBP2 na różnych etapach różnicowania komórek β .

3) Stworzenie modelu indukowanej delecji genu *FKBP2* (ang. *FKBP2* inducible gene deletion; inducible knockout, iKO).

Model iKO opracowano w oparciu o system Tet-On CRISPR/Cas9, pozwalający na kontrolowaną czasowo aktywację endonukleazy Cas9 w obecności doksycykliny. Do komórek hPSC wprowadzono wektor zawierający gen *Cas9* pod kontrolą promotora Tet-On, co umożliwiło jego precyzyjne włączenie w określonym momencie różnicowania. Delecja

genu *FKBP2* była indukowana od dnia 20-go protokołu różnicowania, czyli po uformowaniu się populacji komórek EP. Pozwoliło to na analizę powiązanych z *FKBP2* procesów komórkowych na późnych etapach powstawania komórek β . Skuteczność delekcji genu *FKBP2* na poziomie białka oceniano za pomocą immunofluorescencji. Zastosowanie tego modelu pozwoliło na zbadanie roli *FKBP2* w regulacji funkcji komórek β w sposób kontrolowany czasowo.

4) Analiza ekspresji *FKBP2* w rozwoju ludzkiej trzustki.

Do analizy ekspresji *FKBP2* w trakcie rozwoju trzustki u człowieka wykorzystano materiał biologiczny pochodzący z płodów (PCW13). Ludzkie trzustki przygotowano w Baylor College of Medicine, Houston, TX (USA) za zgodą instytucjonalnej Komisji Bioetycznej, zgoda nr H-3097 dla prof. Małgorzaty Borowiak. Cryo-skrawki tkanek analizowano za pomocą immunofluorescencji z użyciem przeciwciał przeciwko *FKBP2*, CHGA oraz C-PEP. Dodatkowo przeprowadzono analizę publicznie dostępnych danych scRNA-seq z ludzkiej trzustki na różnych etapach rozwoju (PCW4–11) w celu oceny poziomu transkryptów *FKBP2* w poszczególnych subpopulacjach komórek. Zauważono wzrastającą ekspresję transkryptu i syntezę białka *FKBP2* w komórkach endokrynnych, w szczególności w komórkach β wraz z rozwojem i dojrzewaniem trzustki. Połączenie obu metod pozwoliło na precyzyjne określenie dynamiki ekspresji genu oraz syntezy białka *FKBP2* w komórkach endokrynnych rozwijającej się trzustki.

5) Opracowanie wydajnych protokołów różnicowania linii hPSC z całkowitą delecją, indukowaną delecją i nadekspresją genu *FKBP2* do dojrzałych komórek β trzustki.

Dla wszystkich badanych linii hPSC, tj. dla WT, KO, OE i iKO, zastosowano zunifikowany protokół różnicowania do dojrzałych komórek β trzustki. Protokół ten obejmował kolejne etapy: hPSC, DE, PP, EP, wczesne komórki β oraz dojrzałe komórki β . Różnicowanie indukowano przy użyciu zdefiniowanych czynników wzrostowych i inhibitorów szlaków sygnałowych, zgodnie z opublikowanymi protokołami ³⁹. Poziom ekspresji markerów na poszczególnych etapach (SOX17, PDX1, NKX6.1 oraz INS) monitorowano za pomocą immunofluorescencji lub cytometrii przepływowej. Dzięki zastosowaniu tego podejścia możliwe było porównanie wpływu *FKBP2* w różnych warunkach hodowli, w przypadku jego normalnej ekspresji, braku bądź nadekspresji na przebieg różnicowania do dojrzałych komórek β .

6) Charakterystyka ultrastruktury ziarnistości insulinowych w komórkach β .

Ultrastrukturę ziarnistości insulinowych zbadano z wykorzystaniem mikroskopii ze strukturalnym oświetleniem (ang. *structured illumination microscopy*, SIM) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *transmission electron microscopy*, TEM). Preparaty barwiono i analizowano pod kątem liczby, wielkości i stopnia dojrzałości ziarnistości zawierających insulinę. Do badań SIM wykorzystano barwienia immunofluorescencyjne specyficzne dla INS lub C-PEP. Zastosowane metody pozwoliły na precyzyjną ocenę morfologii ziarnistości i jej porównanie pomiędzy komórkami β typu dzikiego oraz KO. Dzięki temu możliwe było precyzyjne określenie wpływu FKBP2 na proces formowania ziarnistości insulinowych.

7) Ocena przetwarzania insuliny w komórkach β .

Analizy przetwarzania insuliny obejmowały oznaczenia wydajności poszczególnych etapów procesu dojrzewania insuliny oraz poziomy kluczowych białek zaangażowanych w ten proces. W tym celu zostały wykonane oznaczenia poziomu ekspresji mRNA oraz białka dla insuliny, proinsuliny, C-PEP, PC1/3, CPE oraz białka p115. Syntezę i lokalizację subkomórkową białek oceniano metodami immunofluorescencji i western blot. Dodatkowo wykonano test wydzielania insuliny w odpowiedzi na depolaryzację błony komórkowej roztworem 30 mM KCl. Stężenie insuliny w nadsączu analizowano przy użyciu testu ELISA. Zastosowane metody pozwoliły na ocenę syntezy i wydzielania insuliny z komórek β z delecją *FKBP2* w porównaniu do kontroli, w której *FKBP2* ulegał ekspresji na poziomie fizjologicznym. Dzięki temu wykazano wpływ obecności lub braku FKBP2 na prawidłowość przetwarzania proinsuliny.

8) Pomiar poziomu cytoplazmatycznego wapnia i syntezy białka SERCA2.

Stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie mierzono z użyciem barwnika Fluo-4 AM i mikroskopii konfokalnej. Poziom syntezy białka SERCA2 oceniono metodą immunofluorescencji. W komórkach β z delecją genu *FKBP2* zaobserwowano wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} i spadek syntezy SERCA2 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Dzięki temu możliwe było wykazanie, że FKBP2 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowej.

9) Indukcja stresu siateczki śródplazmatycznej (ER) z użyciem DTT.

W celu wywołania stresu ER komórki hPSC zróżnicowane do stadium EP inkubowano z 1 mM DTT, który jako czynnik redukujący zaburza tworzenie mostków dwusiarczkowych, prowadząc do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek. Komórki różnicowano przez 8 dni – od stadium EP aż do uzyskania dojrzałych komórek β . Następnie oceniono poziom ekspresji markerów stresu ER, w tym ATF6, a także syntezę białka HDAC9, w kontekście jego potencjalnego wpływu na różnicowanie i funkcjonowanie komórek β .

10) Analiza transkryptomu na poziomie pojedynczych komórek (scRNA-seq).

Analizę transkryptomu pojedynczych komórek przeprowadzono na dwóch etapach dojrzewania komórek β : wczesnym (w dniu 21, oznaczonym jako d21) oraz późnym (w dniu 31, d31). Komórki zamykano w mikrokroplach, przy użyciu systemu 10x Genomics Chromium, a następnie przygotowywano biblioteki cDNA, które poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane dane analizowano bioinformatycznie z wykorzystaniem pakietów Seurat i RStudio, co pozwoliło na identyfikację subpopulacji oraz określenie ich profilu molekularnego. Szczególną uwagę zwrócono na geny związane ze stresem ER, procesami syntezy i degradacji białek oraz różnicowaniem i dojrzewaniem komórek β . Takie podejście umożliwiło porównanie transkryptomu komórek z nokautem genu *FKBP2* (KO) z warunkami kontrolnymi (WT).

11) Analiza trajektorii różnicowania i odległości molekularnych pomiędzy warunkami kontrolą a delecją FKBP2 (WT i KO).

Do analizy dynamiki różnicowania zastosowano analizę głównych składowych (PCA) oraz pomiary odległości z wykorzystaniem metryk Euklidesowej i Mahalanobisa. Trajektorie przejścia od stadium EP do w pełni dojrzałych komórek β zrekonstruowano przy użyciu pakietów Monocle3 i Seurat, co pozwoliło na szczegółowe uchwycenie kolejnych etapów tego procesu. Obliczanie odległości molekularnych umożliwiło ilościowe porównanie podobieństwa fenotypowego pomiędzy liniami kontrolnymi (WT) a komórkami z delecją genu *FKBP2* (KO). Podejście to pozwoliło precyzyjnie ocenić, w jaki sposób brak *FKBP2* modyfikuje trajektorię różnicowania i dojrzewania komórek β oraz wpływa na stabilność ich „tożsamości komórkowej”.

12) Zahamowanie aktywności HDAC9 i jego wpływ na różnicowanie komórek β .

W komórkach KO stwierdzono zwiększoną syntezę HDAC9, co umożliwiło oszacowanie efektów jej farmakologicznej inhibicji. W tym celu zastosowano TMP195, selektywny inhibitor HDAC klasy II. Komórki poddano działaniu inhibitora w trakcie procesu różnicowania, a następnie analizowano ich profil molekularny. Syntezę markerów komórek α oraz β oceniano metodą immunofluorescencji, co pozwoliło określić w jaki sposób modulacja epigenetyczna wpływa na różnicowanie w warunkach KO. Zastosowane podejście pozwoliło również na zbadanie powiązań pomiędzy aktywnością FKBP2 a regulacją epigenetyczną w komórkach β , w tym ich zdolnością do prawidłowej syntezy białek niezbędnych do ich dojrzewania i funkcjonowania.

13) Aktywacja szlaku NFAT i jego pośredni wpływ na różnicowanie komórek β .

W warunkach KO zaobserwowano zwiększoną syntezę białka NFAT2, które w dużej mierze lokalizowało się w jądrze komórkowym, co wskazywało na aktywację szlaku sygnałowego NFAT. Zostało to potwierdzone zarówno metodą immunofluorescencji, jak i ilościową analizą sygnału jądrowego. Dodatkowo, w celu weryfikacji wzmożonej syntezy NFAT2, przeprowadzono analizę western blot. Połączenie badań molekularnych z obrazowaniem konfokalnym pozwoliło na precyzyjną ocenę aktywności tego czynnika transkrypcyjnego. Postawiono hipotezę, że zmiany w aktywności regulonu *NFAT2* mogą wpływać na ekspresję HDAC9, co sugeruje istnienie funkcjonalnego powiązania pomiędzy szlakiem NFAT a epigenetyczną kontrolą różnicowania komórek β .

Research assumptions and their characteristics

1) Development and validation of a hPSC cell model with *FKBP2* gene deletion (KO).

In order to obtain a cell model with *FKBP2* gene deletion, the CRISPR/Cas9 system was used with sgRNAs designed to target exons 1, 2, and 6 of the *FKBP2* gene. hPSCs (HUES8-iCas9) were lipofected with the sgRNA construct, and single cell clones were then isolated under adherent culture conditions. Clones were genotyped using PCR, and the presence of the deletion in the *FKBP2* gene was confirmed by Sanger sequencing. In selected clonal hPSC lines differentiated towards β -cells, the absence of FKBP2 protein synthesis was confirmed by Western blot and immunofluorescence. Two of the eleven obtained KO lines, which were characterized by a consistent phenotype during differentiation, were selected for further studies.

2) Development and validation of a model with *FKBP2* gene overexpression (OE).

The *FKBP2* gene overexpression model was developed using a plasmid vector based on the PiggyBac and Tet-On systems, into which the *FKBP2* coding sequence linked to a FLAG tag was introduced. The plasmid was introduced into hPSCs by lipofection, followed by selection of cell lines using puromycin. In the obtained lines, *FKBP2* gene expression was induced by adding 1 μ g/mL doxycycline to the medium, which allowed for temporary and controlled activation of the transgene. The level of FKBP2 protein synthesis was assessed by Western blot and immunofluorescence. In this way, a model was obtained that allowed the analysis of the effects of increased FKBP2 synthesis at different stages of β -cell differentiation.

5) Creation of a *FKBP2* inducible gene deletion (inducible knockout, iKO).

The iKO model was developed based on the Tet-On CRISPR/Cas9 system, which allows for time-controlled activation of the Cas9 endonuclease in the presence of doxycycline. A vector containing the Cas9 gene under the control of the Tet-On promoter was introduced into hPSC cells, enabling its precise activation at a specific point in differentiation. *FKBP2* gene deletion was induced on day 20 of the differentiation protocol, i.e., after the formation of the EP cell population. This allowed for the analysis of FKBP2-related cellular processes in the late stages of β -cell formation. The effectiveness of *FKBP2* gene deletion at the protein level was assessed by immunofluorescence. The use of this model allowed us to investigate the role of FKBP2 in the regulation of β -cell function in a time-controlled manner.

4) Analysis of *FKBP2* expression in human pancreatic development.

Biological material from fetuses (PCW13) was used to analyze *FKBP2* expression during human pancreatic development. Human pancreatic tissues were prepared at Baylor College of Medicine, Houston, TX (USA) with the approval of the institutional Bioethics Committee, approval no. H-3097 for Prof. Małgorzata Borowiak. Tissue sections were analyzed by immunofluorescence using antibodies against FKBP2, CHGA, and C-PEP. In addition, publicly available scRNA-seq data from the human pancreas at different stages of development (PCW4–11) were analyzed to assess the level of *FKBP2* transcripts in individual cell subpopulations. Increasing transcript expression and FKBP2 protein synthesis were observed in endocrine cells, particularly in β -cells, as the pancreas developed and matured. The combination of both methods allowed for precise determination of the dynamics of gene expression and FKBP2 protein synthesis in endocrine cells of the developing pancreas.

5) Development of efficient protocols for the differentiation of hPSC lines with complete deletion, induced deletion, and overexpression of the *FKBP2* gene into mature pancreatic β cells.

For all hPSC lines studied, i.e., WT, KO, OE, and iKO, a unified protocol for differentiation into mature pancreatic β -cells was used. This protocol included the following stages: hPSC, DE, PP, EP, early β -cells, and mature β -cells. Differentiation was induced using defined growth factors and signaling pathway inhibitors, in accordance with published protocols ³⁹. The expression levels of markers at individual stages (SOX17, PDX1, NKX6.1, and INS) were monitored using immunofluorescence or flow cytometry. This approach made it possible to compare the effect of FKBP2 under different culture conditions, in the case of its normal expression, absence, or overexpression, on the course of differentiation into mature β -cells.

6) Characterization of the ultrastructure of insulin granules in β -cells.

The ultrastructure of insulin granules was examined using structured illumination microscopy (SIM) and transmission electron microscopy (TEM). The preparations were stained and analyzed for the number, size, and degree of maturity of insulin-containing granules. INS- or C-PEP-specific immunofluorescence staining was used for SIM studies. The methods used allowed for precise assessment of granule morphology and its comparison between different

β - cells. This made it possible to precisely determine the effect of FKBP2 on the process of insulin granule formation.

7) Assessment of insulin processing in β -cells.

Insulin processing analyses included measurements of the efficiency of individual stages of insulin maturation and the levels of key proteins involved in this process. For this purpose, measurements of mRNA and protein expression levels were performed for insulin, proinsulin, C-PEP, PC1/3, CPE, and p115 protein. Protein synthesis and subcellular localization were assessed by immunofluorescence and Western blot methods. In addition, an insulin secretion test was performed in response to cell membrane depolarization with a 30 mM KCl solution. Insulin concentration in the supernatant was analyzed using an ELISA test. The methods used allowed for the assessment of insulin synthesis and secretion from β -cells with *FKBP2* deletion in comparison to the control, in which *FKBP2* was expressed at physiological levels. This made it possible to demonstrate the effect of the presence or absence of FKBP2 on the correct processing of proinsulin.

8) Measurement of cytoplasmic calcium levels and SERCA2 protein synthesis.

The concentration of Ca^{2+} ions in the cytoplasm was measured using Fluo-4 AM dye and confocal microscopy. The level of SERCA2 protein synthesis was assessed by immunofluorescence. In β -cells with *FKBP2* gene deletion, an increase in cytoplasmic Ca^{2+} levels and a decrease in SERCA2 synthesis were observed compared to control cells. This made it possible to demonstrate that FKBP2 plays an important role in maintaining calcium homeostasis.

9) Induction of endoplasmic reticulum (ER) stress using DTT.

To induce ER stress, hPSCs differentiated into EPs were incubated with 1 mM DTT, which, as a reducing agent, disrupts disulfide bond formation, leading to the accumulation of misfolded proteins. The cells were differentiated for 8 days – from the EP stage until mature β -cells were obtained. The expression levels of ER stress markers, including ATF6, as well as HDAC9 protein synthesis, were then assessed in the context of its potential impact on β -cell differentiation and function.

10) Single-cell transcriptomics (scRNA-seq).

Single-cell RNA analysis was performed at two stages of β -cell maturation: early (on day 21, designated d21) and late (on day 31, d31). The cells were encapsulated in microdroplets using the 10x Genomics Chromium system, and then cDNA libraries were prepared and sequenced. The obtained data were analyzed bioinformatically using Seurat and RStudio packages, which allowed for the identification of subpopulations and the determination of their molecular profile. Particular attention was paid to genes related to ER stress, protein synthesis and degradation processes, and β -cell differentiation and maturation. This approach allowed for a comparison of the transcriptome between control conditions (WT, normal *FKBP2* expression) and cells with a knockout of this gene (KO).

11) Analysis of differentiation trajectories and molecular distances between conditions (WT and KO controls).

Principal component analysis (PCA) and distance measurements using Euclidean and Mahalanobis metrics were used to analyze the dynamics of differentiation. The trajectories of transition from the EP stage to fully mature β -cells were reconstructed using the Monocle3 and Seurat packages, which allowed for detailed capture of the successive stages of this process. The calculation of molecular distances enabled a quantitative comparison of phenotypic similarity between control lines (WT) and cells with *FKBP2* gene deletion (KO) cells. This approach allowed for a precise assessment of how the absence of FKBP2 modifies the trajectory of β -cell differentiation and maturation and affects the stability of their “cellular identity.”

12) Inhibition of HDAC9 activity and its effect on β -cell differentiation.

Increased HDAC9 synthesis was observed in KO cells, which allowed for the estimation of the effects of its pharmacological inhibition. For this purpose, TMP195, a selective class II HDAC inhibitor, was used. The cells were exposed to the inhibitor during the differentiation process and then their molecular profile was analyzed. The synthesis of α - and β -cell markers was assessed by immunofluorescence, which allowed us to determine how epigenetic modulation affects differentiation in KO conditions. The approach also led us to investigate the links between FKBP2 activity and epigenetic regulation in β -cells, including their ability to properly synthesize proteins necessary for maturation and function.

13) Activation of the NFAT pathway and its indirect influence on β -cell differentiation.

Under KO conditions, increased synthesis of NFAT2 protein was observed, which was largely localized in the cell nucleus, indicating activation of the NFAT signaling pathway, as confirmed by both immunofluorescence and quantitative analysis of the nuclear signal. Additionally, a Western blot analysis was performed to verify the increased synthesis of NFAT2. The combination of molecular studies and confocal imaging allowed for a precise assessment of the activity of this transcription factor. It was hypothesized that changes in the activity of the NFAT2 regulon may affect HDAC9 expression, suggesting a functional link between the NFAT pathway and epigenetic control of β -cell differentiation.

8. Najważniejsze ustalenia rozprawy doktorskiej

- 1) **Praca przeglądowa:** Jedrzejak AP*, Urbaniak EK*, Wasko JA*, Ziojła N, Borowiak M. Diabetes and SARS-CoV-2—Is There a Mutual Connection? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022 Jun 13; 10:913305. doi: 10.3389/fcell.2022.913305. PMID: 35769263. PMCID: PMC9234398 (*- autorzy równorzędni) ⁴⁰.

W niniejszym artykule przeglądowym dokonano **kompleksowej analizy wzajemnych powiązań pomiędzy cukrzycą a zakażeniem wirusem SARS-CoV-2**, skupiając się jednak nie tylko na skutkach infekcji COVID-19, ale również na **mechanizmach molekularnych i komórkowych leżących u podstaw zaburzeń funkcjonowania komórek β oraz innych komórek endokrynnych wysp trzustkowych, takich jak komórki α , δ czy PP**. Zwrócono również uwagę na mechanizmy stresu ER, wywołane tzw. „burzą cytokinową”, tj. masowemu i nagłemu uwalnianiu cytokin i chemokin, stanem zapalnym komórek oraz ich synergicznemu wpływowi na rozwój cukrzycy, zarówno T1D, jak T2D. Omówiono również, w jaki sposób różne czynniki wywołujące stres – w tym infekcje wirusowe, ale także czynniki metaboliczne, immunologiczne i środowiskowe – mogą wpływać na homeostazę komórek β , prowadząc do ich dysfunkcji, a nawet śmierci.

Podkreślono, że pandemia COVID-19 stała się unikalnym punktem wyjścia do szerszego spojrzenia na zaburzenia metaboliczne i cukrzycę w kontekście stresu ogólnoustrojowego. Zauważono, że u pacjentów zakażonych wirusem SARS-CoV-2 obserwowano częste przypadki dekompensacji metabolicznej, a także nowo rozpoznany typ cukrzycy, co skłoniło badaczy do dalszej eksploracji powiązań między ostrym zapaleniem a funkcją trzustki. Publikacja nie ogranicza się jednak jedynie do efektów zakażenia wirusowego - potraktowano pandemię jako model analityczny do zrozumienia szerszego problemu: **w jaki sposób przewlekły stan zapalny i stres komórkowy wpływają na funkcjonowanie i przeżycie komórek β trzustki?**

W pracy wykazano, że receptory za pośrednictwem których wirus SARS-CoV-2 wnika do komórek, takie jak enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. *angiotensin converting enzyme 2*, ACE2), transbłonowa proteaza serynowa 2 (ang. *transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2), neuropilina 1 (ang. *neuropilin 1*, NRP1) i dipeptydylopeptydaza 4 (ang. *dipeptidyl peptidase 4*, DPP4) – są obecne nie tylko w tkance płucnej, ale również w

komórkach trzustki ⁴¹⁻⁴⁴. Szczególnie istotna jest synteza tych białek w komórkach β , a także w innych komórkach wysp trzustkowych – α , δ , PP i ϵ – co może oznaczać, że wirus SARS-CoV-2 ma potencjał do wywoływania kompleksowych zaburzeń wysp Langerhansa trzustki ⁴⁵⁻⁴⁷ (**Rycina 1, publikacja 1**).

Stres retikulum endoplazmatycznego (ER) i utrata funkcji komórek β

W publikacji podkreślono, że stres ER odgrywa istotną rolę w patogenezie zarówno cukrzycy T1D, jak i T2D ^{48,49}. Komórki β , z racji ich wysokiej aktywności wydzielniczej i konieczności produkcji dużych ilości proinsuliny, są szczególnie wrażliwe na przeciążenie ER. Utrata równowagi pomiędzy zapotrzebowaniem na syntezę białek a możliwościami komórki w zakresie ich prawidłowego fałdowania i transportu prowadzi do aktywacji szlaków stresu ER.

Rola cytokin i odpowiedzi zapalnej w dysfunkcji komórek β

Odpowiedź zapalna odgrywa ważną rolę w zaburzeniach funkcji komórek β trzustki, zarówno w cukrzycy T1D jak i T2D ⁵⁰. Wskazano, że w przebiegu infekcji SARS-CoV-2, jak również w przewlekłych stanach zapalnych towarzyszących zespołowi metabolicznemu, może dochodzić do wzmożonej produkcji cytokin i chemokin, prowadząc do stresu komórkowego i uszkodzeń tkanek trzustki.

W szczególności, na podstawie wyników transkryptomiki zainfekowanych pierwotnych ludzkich wysp trzustkowych, wykazano podwyższoną ekspresję wielu czynników zapalnych, takich jak interleukina 1 B (ang. *interleukin 1B*, IL1B), antagonisty receptora interleukiny 1, (ang. *Interleukin 1 Receptor Antagonist*, IL1RN), szeregu chemokin takich jak: chemokina CC ligand 2 (ang. *chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2), zwana również białkiem chemotaktycznym monocytów-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), chemokiny CCL3, CCL4 oraz CCL8, chemokin prozapalnych CXCL1/GRO α oraz CXCL2 i CXCL5, a także interferonów i genów związanych z sygnalizacją sygnałową komórek w odpowiedzi na wirusy ⁵¹⁻⁵³. Wzrost ekspresji tych czynników potwierdzono również metodą ELISA. Podobną aktywację zapalną zaobserwowano w modelach komórek przewodowych i zrazikowych pochodzących z hPSC po zakażeniu SARS-CoV-2 ⁵⁴.

„Burza cytokinowa” i efekt ogólnoustrojowy

W kontekście ostrych infekcji, takich jak COVID-19, omówiliśmy zjawisko tzw. „burzy cytokinowej”, które może prowadzić do uszkodzeń wielu narządów, w tym trzustki. Zwrócono uwagę, że u pacjentów z ciężkim przebiegiem COVID-19 obserwowano nacieki komórek zapalnych w obrębie trzustki, obecność markerów zapalenia śródbłona (np. cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1, ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM1; znany również pod nazwą CD54; ang. *Cluster of Differentiation 54*) oraz podwyższone stężenia wybranych chemokin, takich jak CXCL10 czy CXCL11 w hodowlach zakażonych wysp trzustkowych^{55–57}.

Choć w publikacji nie stwierdzono jednoznacznie, że „burza cytokinowa” prowadzi do rozwoju cukrzycy, to sugeruje się, że może ona być jednym z czynników przyczyniających się do rozwoju hiperglikemii lub dekompensacji metabolicznej u osób z wykrytą wcześniej cukrzycą lub określonymi predyspozycjami metabolicznymi^{56,58}.

Efekt SARS-CoV-2 na różne typy komórek trzustkowych

Oprócz komórek β , w publikacji wspomniano także o potencjalnej wrażliwości innych typów komórek wyspowych, takich jak komórki α (produkujące glukagon), δ (produkujące somatostatynę), PP (produkujące polipeptyd trzustkowy) i ϵ (produkujące grelinę), na zakażenie SARS-CoV-2. Wykazano, że ekspresja receptorów wirusowych może różnić się poziomem, ale i ich rozmieszczeniem w komórce, co może być podłożem dla różnic indywidualnych w odpowiedzi komórek trzustki na infekcję^{59,60}.

Znaczenie komórek odpornościowych i nacieków wyspowych

Należy podkreślić, że w przebiegu cukrzycy – szczególnie typu 1 – istotną rolę odgrywa odpowiedź autoimmunologiczna. Nacieki wysp trzustkowych przez komórki odpornościowe, głównie limfocyty T, może prowadzić do bezpośredniego niszczenia komórek β . Z kolei w cukrzycy T2D, chociaż proces nie ma charakteru klasycznie autoimmunologicznego, obserwuje się również stany zapalne w obrębie wysp, w których udział biorą makrofagi i inne komórki odporności wrodzonej^{11,61}.

W podsumowaniu wskazano, że zaburzenia funkcji i przeżycia komórek β są skutkiem złożonej interakcji czynników metabolicznych, zapalnych i środowiskowych. Podkreślono, że zarówno cukrzyca T1D, jak i T2D, charakteryzują się wspólnym elementem – postępującą utratą zdolności komórek β do wydzielania insuliny. Wśród mechanizmów leżących u podstaw tego procesu wyróżniono: stres ER, stres zapalny, cytotoksyczność wywołaną cytokinami, lipotoksyczność oraz potencjalny wpływ infekcji wirusowych.

W związku z tym sugeruje się, że **przyszłe terapie powinny koncentrować się nie tylko na kontroli glikemii, ale również na ochronie i regeneracji komórek β – poprzez ograniczenie stresu komórkowego, hamowanie cytokin prozapalnych oraz wsparcie mechanizmów adaptacyjnych komórki.**

- 2) **Praca przeglądowa:** Urbaniak E, Henry S, Lalowski M, Borowiak M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Feb 20;13:1502469. doi: 10.3389/fcell.2025.1502469. PMID: 40052150; PMCID: PMC11882602 ³².

W pracy przeglądowej zwrócono uwagę na **proces dojrzewania insuliny w komórkach β trzustki ze szczególnym uwzględnieniem etapów i białek towarzyszących temu procesowi, wraz z ich charakterystyką**. Prawidłowe fałdowanie białek jest procesem niezbędnym dla ich funkcjonalności. Komórki eukariotyczne wykształciły złożone mechanizmy kontrolujące ten proces, w tym sieć białek opiekuńczych i system proteostazy, które zapewniają prawidłowe dojrzewanie białek oraz utrzymanie ich aktywnej konformacji⁶². W przypadku insuliny, hormonu odpowiedzialnego za homeostazę glukozy, zaburzenia procesu składania i dojrzewania prowadzą do jej niewłaściwej syntezy, gromadzenia się nieprawidłowo sfałdowanych form białka oraz stresu siateczki śródplazmatycznej, co przyczynia się do rozwoju cukrzycy ^{63,64}.

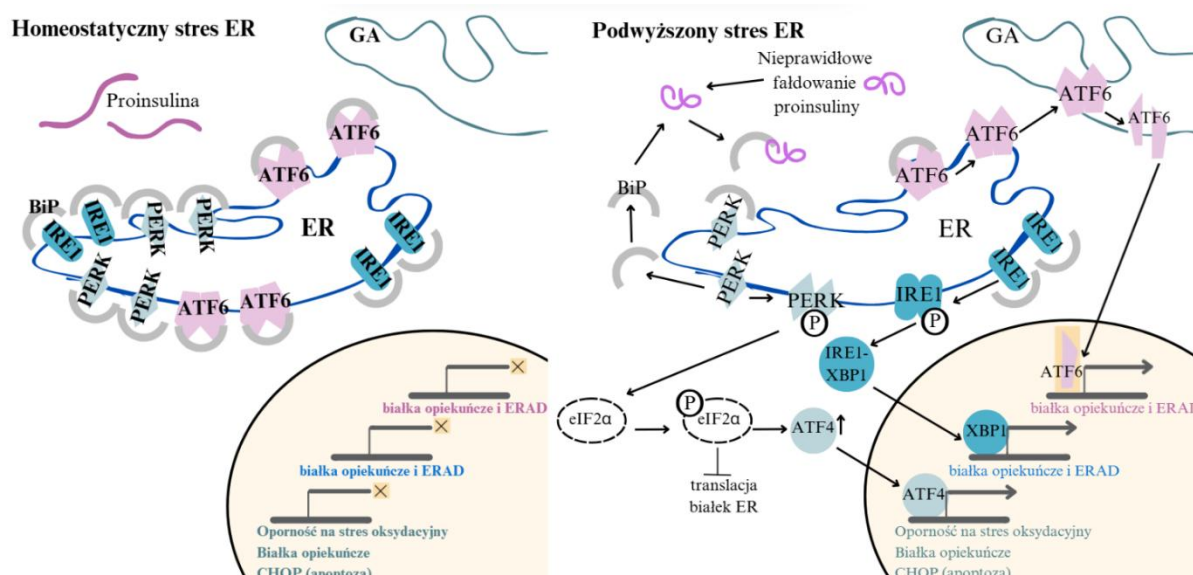
Synteza insuliny w komórkach β trzustki rozpoczyna się od produkcji preproinsuliny – cząsteczki zawierającej peptyd sygnałowy, łańcuch B, peptyd C oraz łańcuch A ³¹. **Jak pokazano na Rycinie 2 (publikacja 2)** sekwencja sygnałowa kieruje preproinsulinę do ER, po czym jest ona odcinana, tworząc proinsulinę. W ER zachodzi kluczowy etap fałdowania proinsuliny, wymagający usieciowania przestrzennego poprzez utworzenie trzech stabilizujących mostków dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny (Cys31–Cys96, Cys43–Cys109, Cys95–Cys100) ⁶⁵. Proces ten jest nadzorowany i wspomagany przez białka opiekuńcze, takie jak BiP/GRP78 i GRP94, które zapobiegają agregacji nieprawidłowo sfałdowanych cząsteczek oraz izomerazy z rodziny PDI (np. dwusulfidoizomeraza białek), które katalizują tworzenie i reorganizację wiązań S–S ⁶⁶. By podtrzymać ciągłość procesu tworzenia mostków dwusiarczkowych, PDI podlega procesom oksydacji, przy użyciu enzymu oksydoreduktazy ERO1, generując przy tym nadtlenek wodoru (H₂O₂), który następnie jest neutralizowany, m.in. przez peroksyredoksynę 4 (PRDX4) i peroksydazę glutationową 7 (GPX7) ^{67,68} (**Rycina 4, publikacja 2**).

Oprócz mostków dwusiarczkowych, w procesie powstawania dojrzałej insuliny istotna jest również izomeryzacja proliny, dzięki której struktura proinsuliny przyjmuje preferowaną konformację *trans*. Za katalizę tej zmiany odpowiada, m. in. białko FKBP2, którego synteza obniża się w komórkach β pochodzących od dawców z T2D ³⁸. W dalszych etapach

prawidłowo sfałdowana proinsulina ulega dalszym modyfikacjom, np. glikozylacji, a następnie jest pakowana do pęcherzyków transportowych COPII (z udziałem białek SAR1, SEC23, SEC24, SEC13 czy SEC31) i przemieszczana z ER do aparatu Golgiego^{69,70}.

W aparacie Golgiego proinsulina podlega obróbce proteolitycznej katalizowanej przez konwertazy PC1/3, PC2, które wycinają peptyd C, oraz karboksypeptydazę E (CPE), która usuwa pozostałe reszty aminokwasowe na końcach łańcuchów, prowadząc do powstania dwóch ostatecznych cząsteczek: dojrzałej, w pełni funkcjonalnej insuliny i peptydu C⁷¹. Dojrzała insulina jest magazynowana w postaci stabilnych heksamerów (sześć cząsteczek insuliny związanych jonami cynku) w pęcherzykach wydzielniczych, skąd uwalniana jest w odpowiedzi na bodźce glukozowe⁷². Sam proces sekrecji zachodzi dwuetapowo, pierwszy etap to szybkie uwolnienie z już gotowych ziarnistości, a drugi to wolniejsze przemieszczanie się insuliny z puli rezerwowej⁷³.

Zaburzenia w fałdowaniu proinsuliny mogą wynikać z mutacji w genie *INS* (np. w cukrzycy młodzieńczej indukowanej mutacją genu insuliny (ang. *Mutant INS-gene-induced Diabetes of Youth*, MIDY) prowadząc do zmian aminokwasowych na poziomie białka, takich jak: G(B8)V, Y(B26)C, L(A16)P, H(B5)D, V(B18)A), lub w genach kodujących białka opiekuńcze i białka ER (*WFS1*, *HSPA5*, *EIF2AK3*, *DNAJC3*), a także w genach kodujących białka transportowe, takie jak GLUT2 czy białka rodziny SLC^{74,75}. Nieprawidłowo sfałdowane cząsteczki insuliny są akumulowane i aktywują szlak adaptacyjnej odpowiedzi na stres ER, tzw. UPR za pomocą “sensorów stresu”, takich jak kinaza białkowa retikulum endoplazmatycznego PERK, białko wymagające inozytol 1 (IRE1) oraz czynnik transkrypcyjny 6 (ATF6). PERK fosforyluje eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2 (ang. *eukaryotic translation initiation factor 2*, eIF2 α), hamując translację i wspomagając ekspresję czynnik transkrypcyjny 4 (ang. *activating transcription factor 4*, ATF4), który z kolei aktywuje działający proapoptotycznie czynnik transkrypcyjny, homolog białka C/EBP (ang. *transcription factor C/EBP homologous protein*, CHOP). IRE1 aktywuje XBP1, a ATF6 po przemieszczeniu się do jądra reguluje ekspresję genów usprawniających fałdowanie białek⁷⁶ (Rycina 3, publikacja 2).



Rycina 3. Schemat działania odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego (ER).

Lewy panel – w warunkach homeostazy ER prawidłowo fałdująca się proinsulina poddawana jest „kontrolnej jakości”. Chaperonowe białko BiP (ang. *binding immunoglobulin protein*) wiąże się z trzema głównymi „sensorami stresu” ER (IRE1, PERK, ATF6), utrzymując je w stanie nieaktywnym. Prawy panel – w warunkach podwyższonego stresu ER spowodowanego nieprawidłowym fałdowaniem proinsuliny BiP odłącza się od sensorów, co prowadzi do aktywacji szlaków PERK–eIF2α–ATF4, IRE1–XBP1 oraz ATF6. Czynniki te stymulują ekspresję białek opiekuńczych, elementów degradacji źle sfałdowanych białek (ERAD) i genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny, a w przypadku przewlekłego stresu także indukcję apoptozy. **Na podstawie Urbaniak i wsp., publikacja 2.**

Przewlekły stres ER, wynikający z zaburzeń w procesie fałdowania proinsuliny, stanowi kluczowy czynnik patogenetyczny prowadzący do dysfunkcji i apoptozy komórek β trzustki, co w konsekwencji przyczynia się do progresji cukrzycy. Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw tej patologii jest fundamentem dla rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Długotrwałe obciążenie aparatu biosyntetycznego komórek β , spowodowane akumulacją nieprawidłowo sfałdowanej proinsuliny, inicjuje kaskadę zdarzeń o charakterze destrukcyjnym. Nadmierna aktywacja szlaku UPR prowadzi do przesunięcia jego funkcji z adaptacyjnej na proapoptotyczną. W warunkach niemożliwego do skompensowania stresu, mechanizmy UPR zamiast przywracać homeostazę komórkową, aktywują szlaki sygnałowe prowadzące do programowanej śmierci komórki (apoptoza) ^{63,66}. Proces ten skutkuje stopniową utratą masy funkcjonalnych komórek β .

Agregacja nieprawidłowo sfałdowanych cząsteczek proinsuliny może skutkować tworzeniem się złogów amyloidowych. Są to struktury bogate w β -harmonijki, odporne na degradację proteolityczną i są jedną z charakterystycznych zmian w patologii trzustki u osób z T2D ⁷⁷. Gromadzenie się złogów amyloidowych prowadzi do zaburzeń w prawidłowej fizjologii

komórek β . Złogi amyloidowe mogą odkładać się w tkankach docelowych, takich jak wątroba czy mięśnie szkieletowe, gdzie zaburzają transdukcję sygnału insulinowego, pogłębiając ogólnoustrojową insulinoporność⁷⁸.

Obecnie rozwijane strategie terapeutyczne w cukrzycy oparte są na poprawie stanu homeostazy ER, wspomaganiu fałdowania białek, a także na terapiach genowych ukierunkowanych na kluczowe białka szlaku syntezy i dojrzewania insuliny^{79,80}. Ponadto, opracowywane są tzw. opiekunów chemicznych (ang. *chemical chaperones*), czyli małych cząsteczek, które pomagają proinsulinie przyjąć prawidłowy kształt. Testowane są również leki, które obniżają poziom stresu ER.

Podsumowując, fałdowanie proinsuliny jest procesem niezwykle złożonym i wymagającym energetycznie. Wysokie tempo syntezy insuliny sięgające 6000 cząsteczek preproinsuliny na sekundę na jedną komórkę β , stanowi ogromne obciążenie metaboliczne dla ER^{64,81}. Czyni to komórki β szczególnie podatnymi na zaburzenia proteostazy. **W momencie, gdy proces fałdowania jest zaburzony, dochodzi do zmniejszenia ilości prawidłowo sfaldowanej, funkcjonalnej insuliny, aktywacji stresu ER, a w konsekwencji do obumierania komórek β i progresji cukrzycy.** Zrozumienie mechanizmów molekularnych regulujących fałdowaniem i dojrzewaniem insuliny otwiera drogę do nowych terapii, zarówno farmakologicznych, jak i komórkowych, mogących w przyszłości przyczynić się do skuteczniejszego leczenia cukrzycy T1D i T2D.

3) **Praca oryginalna:** Urbaniak E, Baginska M, Szlachcic W, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec M, and Borowiak M. ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9. *BioRxiv* 2025.09.01.672695. doi: 10.1101/2025.09.01.672695 (preprint) ⁸².

Wcześniejsze badania z moim udziałem wykazały syntezę FKBP2 w ludzkich komórkach β *in vivo* ³⁸. Bazując na tych wynikach, szczegółowo przeanalizowano syntezę FKBP2 w ludzkiej dorosłej trzustce. Barwienia immunofluorescencyjne oraz mikroskopia konfokalna potwierdziły obecność FKBP2 w większości komórek produkujących insulinę, podczas gdy komórki typu δ , wytwarzające somatostatynę, jedynie sporadycznie wykazywały obecność tego białka (**Rycina 1A, publikacja 3**). Część komórek typu α produkujących glukagon również wykazywała immunoreaktywność z przeciwciałami rozpoznającymi FKBP2 (**Rycina S1A, publikacja 3**). Równolegle, analiza danych z sekwencjonowania pojedynczych komórek RNA dorosłej ludzkiej trzustki, wykazała obecność transkryptu *FKBP2* w komórkach endokrynnych, w tym w komórkach β ⁸³ (**Rycina S1B, publikacja 3**).

W celu zbadania roli FKBP2 w rozwoju ludzkich komórkach β , zastosowano model ukierunkowanego różnicowania *in vitro* komórek hPSC, w oparciu o wcześniej ustalone protokoły ^{20,21,84}. Proces ten obejmował sekwencyjne przejścia komórek przez kolejne stadia rozwojowe: DE, PP, EP, aż do uzyskania komórek β (**Rycina 2, Wstęp**). Barwienia immunofluorescencyjne oraz cytometria przepływowa, metody wizualizujące markery specyficzne dla kolejnych etapów, takich jak OCT3/4 (hPSC), FOXA2 (DE), PDX1 i NKX6.1 (PP), chromograninę A (CHGA, EP), C-peptyd (C-PEP), oraz insulinę i NKX6.1 potwierdziły prawidłowy przebieg różnicowania (**Ryciny 1B i S1C, publikacja 3**).

Analiza publicznie dostępnych danych sekwencjonowania pojedynczych komórek RNA z procesu różnicowania komórek β wskazała na ekspresję mRNA dla *FKBP2* w komórkach EP oraz w komórkach β . Barwienia immunofluorescencyjne i analiza metodą western blot ujawniły obecność zwiększonej ilości białka FKBP2 począwszy od etapu EP, a jego synteza utrzymywała się w komórkach β (wykazujących ekspresję CHGA i INS) zarówno we wczesnym (dzień 21), jak i późnym (dzień 31) etapie różnicowania (**Ryciny 1C i S1E–F, publikacja 3**). Dane te łącznie wskazują, że transkrypt oraz białko FKBP2 ulegają syntezie podczas różnicowania w kierunku endokrynnych komórek β *in vitro*.

Wpływ delekcji *FKBP2* na przetwarzanie i wydzielanie insuliny

Aby zbadać funkcję FKBP2 w komórkach β , wygenerowano hPSC z delecją genu *FKBP2* (FKBP2 KO) przy użyciu CRISPR-Cas9 (**Rycina 1D, publikacja 3**). Skuteczność modyfikacji genetycznej na poziomie DNA potwierdzono za pomocą metody PCR (**Rycina S1G, publikacja 3**) i sekwencjonowania Sangera (**Rycina S1H, publikacja 3**). Brak syntezy białka FKBP2 zweryfikowano metodami western blot (**Ryciny 1E i S1I, publikacja 3**) oraz barwienia immunofluorescencyjnego (**Rycina 1F, publikacja 3**). Stwierdzono, że delekcja genu *FKBP2* nie wpłynęła na syntezę markerów pluripotencji takich jak OCT3/4 i NANOG (**Rycina S1K, publikacja 3**).

Analiza biochemiczna komórek FKBP2 KO zróżnicowanych do komórek β wykazała spadek poziomu dojrzałej insuliny o 70% przy jednoczesnym braku zmian w poziomie proinsuliny. Ponadto odnotowano akumulację C-PEP (**Ryciny 1H-I, publikacja 3**), co wskazuje na zaburzenie procesu proteolitycznego dojrzewania hormonu. W celu potwierdzenia roli FKBP2 w tym procesie, opracowano model komórkowy z indukowaną, zależną od doksycykliny ekspresją białka FKBP2 skoniugowanego ze znacznikiem FLAG (system Tet-On). Indukcja nadekspresji FKBP2-FLAG prowadziła do zwiększonej syntezy białek CHGA, C-PEP i INS (**Ryciny 1J-K i S1M-O, publikacja 3**), co potwierdza kluczową rolę FKBP2 w procesowaniu insuliny.

Konsekwencją zaburzeń procesu przetwarzania proinsuliny, było obniżenie o 42% zdolności wydzielniczej komórek FKBP2 KO w odpowiedzi na stymulację KCl (**Rycina 1L, publikacja 3**). Analiza ultrastruktury komórek z wykorzystaniem mikroskopii SIM oraz TEM, ujawniła istotne zmiany w morfologii ziarnistości insulinowych. W komórkach KO były one powiększone średnio o 15% (**Rycina 1M, publikacja 3**), co zostało potwierdzone za pomocą analizy ilościowej zdjęć TEM (**Rycina 1N, publikacja 3**). Zaobserwowano również zwiększoną heterogenność i gęstość elektronową ziarnistości, co wskazuje na defekty w ich prawidłowym dojrzewaniu. Uzyskane wyniki dowodzą, że FKBP2 odgrywa istotną rolę w regulacji procesu przetwarzania proinsuliny oraz w dojrzewaniu ziarnistości insulinowych w komórkach β .

Sekwencjonowanie pojedynczych komórek RNA ujawnia zmiany w różnicowaniu i funkcji β -komórek po delecji *FKBP2*

Analiza danych scRNA-seq przeprowadzonej w 31-y dniu różnicowania ujawniły obecność siedmiu klastrow komórkowych zarówno w warunkach kontrolnych (WT), jak i KO (**Ryciny 2A i 2B, publikacja 3**). W komórkach KO zaobserwowano zmniejszenie liczebności klastrow PP2 i EP2 oraz zwiększoną reprezentację komórek w klastrach EP1 i w populacji wczesnych komórek α (**Rycina 2C, publikacja 3**). Kluczową obserwacją była około 1,5-krotna redukcja liczby komórek β . Analiza profilu transkrypcyjnego w obrębie klastra komórek β wykazała częściową utratę ich specyficznej tożsamości molekularnej. W komórkach β w warunkach KO stwierdzono podwyższoną syntezę markerów charakterystycznych dla komórek α (GCG, ETV1) oraz obniżoną syntezę INS, HDAC9 i PPIB (**Ryciny 2D i 2F, publikacja 3**).

Analiza wzbogacenia szlaków sygnałowych (GO i KEGG) wykazała obniżenie ekspresji genów związanych z fałdowaniem białek i funkcjonowaniem ER. Z kolei podwyższonej ekspresji uległy geny zaangażowane w procesy adhezji komórkowej, organizacji cytoszkieletu oraz odpowiedzi na jony wapnia (**Rycina 2E, publikacja 3**). Szczegółowa analiza wykazała obniżony poziom transkryptu dla *PCSK1* (kodującego konwertazę prohormonową PC1/3), kluczowej endopeptydazy inicjującej proteolityczne dojrzewanie proinsuliny. Zmianie tej towarzyszył wzrost syntezy karboksypeptydazy E (ang. *carboxypeptidase E*, CPE), która uczestniczy w końcowych etapach obróbki insuliny oraz białka p115, odgrywającego istotną rolę w transporcie pęcherzykowym pomiędzy ER a aparatem Golgiego. Powyższe dane sugerują, że w odpowiedzi na defekty w fałdowaniu i przetwarzaniu proinsuliny, komórki β uruchamiają mechanizmy kompensacyjne, polegające na aktywacji alternatywnych szlaków jej dojrzewania i transportu w celu częściowego zrównoważenia zaburzeń proteostazy.

Zwiększony stres ER w β -komórkach z niedoborem *FKBP2*

Barwienia immunofluorescencyjne ujawniły podwyższoną syntezę białek ATF6 i PERK – klasycznych markerów aktywacji odpowiedzi UPR – w komórkach β typu KO (**Rycina 3A, publikacja 3**). Zwiększona ilość ATF6 i PERK w komórce świadczy o pobudzeniu głównych szlaków sygnałowych UPR, odpowiedzialnych za przywracanie homeostazy ER poprzez wzmożoną syntezę białek chaperonowych, spowolnienie translacji oraz aktywację

degradacji źle sfałdowanych białek. Równocześnie stwierdzono obniżony poziom SERCA2, pompy wapniowej utrzymującej prawidłowe stężenie jonów wapnia w przestrzeni wewnątrz siateczki śródplazmatycznej ER, co korelowało ze zwiększonym stężeniem wapnia wewnątrzkomórkowego (**Ryciny 3B i 3D, publikacja 3**). Zaburzenia gospodarki wapniowej dodatkowo nasilały stres ER, tworząc samonapędzający się mechanizm. Na podstawie powyższych obserwacji, wyciągnęliśmy wnioski, że niedobór *FKBP2* prowadzi do nieprawidłowego fałdowania proinsuliny. Inicjuje to patologiczną kaskadę zdarzeń, obejmującą aktywację stresu ER oraz zaburzenia homeostazy wapniowej, które wzajemnie się potęgują. W konsekwencji dochodzi do zaburzeń w sekrecji insuliny, co może przyczyniać się do dysfunkcji komórek β i zaburzeń w tolerancji na glukozę (**Rycina 3E, publikacja 3**).

FKBP2 reguluje los komórek α i β

Analiza ogólnodostępnych danych scRNA-seq trzustki płodu ludzkiego wykazała systematyczny wzrost ekspresji transkryptu *FKBP2* między 4-tym a 11-tym tygodniem rozwoju (**Rycina 4A, publikacja 3**). Barwienia immunofluorescencyjne potwierdziły obecność FKBP2 zarówno w komórkach rozwijającego się nabłonka trzustkowego, jak i w komórkach z dodatnim wynikiem barwienia dla C-PEP. Wskazuje to na potencjalną aktywność FKBP2 w trakcie kształtowania się komórek endokrynych *in vivo* (**Rycina 4B, publikacja 3**).

W celu zbadania funkcjonalnego znaczenia FKBP2 w procesie różnicowania, przeprowadzono analizę komórek z delecją genu *FKBP2* (KO). Na etapie PP nie odnotowano zmian w syntezie białka NKX6.1, jednakże osiem dni później, zaobserwowano obniżony poziom kluczowych regulatorów dalszego różnicowania i stabilizacji fenotypu komórek wydzielniczych, białek PDX1 i NKX6.1, w komórkach KO. Dodatkowo analiza syntezy INSM1, wczesnego i przejściowego markera progenitorów endokrynych, ujawniła istotnie podwyższony jego poziom w komórkach KO. Wyniki te wskazują na zaburzenia w procesie różnicowania już na wczesnym etapie rozwoju komórek wydzielniczych (**Ryciny 4C i 4F, publikacja 3**).

Wyniki analizy scRNA-seq przeprowadzonej w 21-ym dniu różnicowania wykazały w warunkach KO zwiększoną liczebność populacji EP2 oraz wszystkich typów komórek wydzielniczych (**Rycina 4H-I, publikacja 3**). Sugeruje to, że brak FKBP2 prowadzi do

przyspieszonego różnicowania progenitorów endokrynnych, kosztem ich prawidłowego dojrzewania i stabilizacji tożsamości komórkowej. Podwyższona synteza białka INSM1, w połączeniu z obniżonym poziomem PDX1 i NKX6.1, dodatkowo wspiera tę hipotezę, wskazując na zaburzenie równowagi pomiędzy proliferacją, różnicowaniem a dojrzewaniem komórek wydzielniczych w warunkach niedoboru *FKBP2*.

Zaburzenia ekspresji oraz syntezy HDAC9 i jego zależność od NFAT2

Co ciekawe, jednym z najbardziej deregulowanych genów zidentyfikowanych w analizie scRNA-seq komórek β w warunkach KO okazał się ***HDAC9***, którego ekspresja uległa dwukrotnej zmianie (**Rycina 2D, publikacja 3**). HDAC9, należący do deacetylaz histonowych klasy IIa, jest syntetyzowany w komórkach β trzustki, a myszy z delecją *Hdac9*^{-/-} wykazują zwiększoną masę komórek β ³⁰. W 21-ym dniu różnicowania stwierdzono podwyższony poziom mRNA dla *HDAC9* w komórkach EP2 linii KO (**Ryciny 6A i 6B, publikacja 3**). Natomiast w 31. dniu różnicowania poziom mRNA dla *HDAC9* był istotnie obniżony w tych populacjach, co może stanowić element odpowiedzi kompensacyjnej po usunięciu genu *FKBP2* (**Ryciny 6D i 6E, publikacja 3**). Barwienia immunofluorescencyjne wykazały jednak odpowiednio trzykrotnie (dzień 21) i 2,5-krotnie (dzień 31) podwyższone poziomy białka HDAC9 w komórkach β dla KO (**Ryciny 6C i 6F, publikacja 3**). Mikroskopia SIM potwierdziła jądrową lokalizację białka HDAC9 zarówno w komórkach kontrolnych (WT), jak i KO, co sugeruje, że zwiększona synteza HDAC9 może wiązać się ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej (**Rycina 6G, publikacja 3**). Funkcjonalną rolę HDAC9 potwierdzono stosując jego inhibicję za pomocą selektywnego inhibitora TMP195. Interwencja ta w populacji EP prowadziła do spowolnienia różnicowania w kierunku komórek α oraz do wzrostu syntezy insuliny (**Ryciny 6J i 6K, publikacja 3**), co wskazuje na udział HDAC9 w modulacji różnicowania się komórek endokrynnych. Ponadto indukcja stresu ER za pomocą DTT skutkowała zwiększoną syntezą białek ATF6 i HDAC9 (**Ryciny 6H i 6I, publikacja 3**), ujawniając potencjalny mechanizm łączący aktywację UPR z regulacją HDAC9.

Utrata białka opiekuńczego (FKBP2) w ER, której wynikiem jest podwyższony poziom HDAC9 w komórkach KO została przez nas powiązana funkcjonalnie z deregulacją mechanizmów transkrypcyjnych. W celu identyfikacji potencjalnych regulatorów transkrypcji genu *HDAC9*, użyliśmy bazy EnrichR TFs_TRANSFAC_JASPAR do analiz *in silico*. Analiza bioinformatyczna wykazała, że HDAC9 może być aktywowany przez czynnik

transkrypcyjny NFATC1 (NFAT2). W sekwencji promotorowej *HDAC9* zlokalizowany jest potencjalny motyw wiążący NFAT2. Analiza wzbogacenia „motywów transkrypcyjnych” (sekwencji wiążących dany czynnik transkrypcyjny; **Ryciny 7A i 7B, publikacja 3**) ujawniła zaburzenia w ścieżkach komórkowych regulowanych przez NFAT2, przy braku różnic w jego ekspresji. Dalsza analiza wyników wykazała, że w warunkach KO sekwencje rozpoznawane przez NFAT2 występują w mniejszej liczbie, co świadczy o obniżeniu aktywności sieci transkrypcyjnych zależnych od tego czynnika. Rodzina NFAT to czynniki transkrypcyjne, których aktywność zależy od oscylacji wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, a ich funkcja jest kluczowa w kontroli ekspresji genów związanych z aktywnością komórek β – w tym genów odpowiedzialnych za regulację glikemii i sekrecję insuliny u myszy^{85–87}.

Zgodnie z powyższymi wynikami, barwienia immunofluorescencyjne ujawniły zwiększoną zawartość białka NFAT2 w komórkach β w KO, przy czym jego dominująca lokalizacja w jądrze komórkowym wskazuje na formę aktywną transkrypcyjnie (**Ryciny 7C i 7E, publikacja 3**). Obserwowana jądrowa akumulacja NFAT2 sugeruje jego aktywność transkrypcyjną, prawdopodobnie indukowaną przez napływ jonów Ca^{2+} wywołany stresem ER. Istotnym potwierdzeniem tej hierarchii w szlaku sygnałowym była farmakologiczna inhibicja *HDAC9*, która nie miała wpływu na poziom NFAT2, co jednoznacznie pozycjonuje NFAT2 jako czynnik nadrzędny względem *HDAC9* (**Ryciny 7F i 7G, publikacja 3**).

Aby potwierdzić, że obserwowany mechanizm jest konsekwencją utraty FKBP2 w dojrzałych komórkach, a nie skutkiem zaburzeń rozwojowych, stworzyliśmy indukowalny model iKO *FKBP2* w hPSC, szczegółowo przedstawiony na **Rycinie S7A (publikacja 3)**. W tym systemie ekspresja Cas9 jest aktywowana przez doksycyklinę, co umożliwia czasowo kontrolowane wycięcie *FKBP2* podczas różnicowania do komórek β . Wstępna charakterystyka modelu wykazała, że indukcja iKO, która została przeprowadzona **na etapie, gdy różnicowane komórki osiągnęły fenotyp komórek β** , nie wpływała na syntezę kluczowych markerów progenitorów endokrynnych, takich jak PDX1, CHGA czy INSM1, a także na poziom *HDAC9* na wczesnym etapie różnicowania (**Ryciny S7B i S7C, publikacja 3**). Dane te potwierdzają, że system iKO pozwala na selektywne badanie funkcji FKBP2 bez zakłócania mechanizmów różnicowania w kierunku endokrynnym.

Analizy immunofluorescencyjne potwierdziły brak FKBP2 w komórkach iKO (**Ryciny 7J i 7K, publikacja 3**) oraz ujawniły statystycznie istotnie podwyższone poziomy ATF6, NFAT2

i GCG, C-PEP (**Ryciny 7L i 7M, publikacja 3**). Wyniki te jednoznacznie wskazują na aktywację odpowiedzi na stres ER, podwyższoną aktywność NFAT2 oraz na przesunięcie osi różnicowania w kierunku komórek α .

Na podstawie uzyskanych danych opracowano schemat mechanistyczny (**Rycina 7H, publikacja 3**), zgodnie z którym utrata białka opiekuńczego FKBP2 prowadzi do nasilenia stresu ER. Stres ER powoduje wzrostu stężenia cytozolowych jonów Ca^{2+} oraz do aktywacji szlaku zależnego od kalmoduliny i kalcyneuryny, czego konsekwencją jest jądrowa lokalizacja i aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFAT2. W konsekwencji prowadzi to do rozregulowania transkrypcji genów docelowych, w tym *HDAC9*, którego nadmierna aktywność sprzyja przeprogramowaniu fenotypowego progenitorów endokrynnych i przesunięcia osi różnicowania w kierunku komórek α kosztem komórek β .

The most important findings of the doctoral dissertation

- 1) Jedrzejak AP*, **Urbaniak EK***, Wasko JA*, Ziojla N, Borowiak M. Diabetes and SARS-CoV-2-Is There a Mutual Connection? *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 13;10:913305. doi: 10.3389/fcell.2022.913305. PMID: 35769263; PMCID: PMC9234398. *- **First co-authors** (Review article) ⁴⁰.

This review article provides a **comprehensive analysis of the interrelationships between diabetes and SARS-CoV-2 infection**, focusing not only on the effects of COVID-19 infection, but also on the **molecular and cellular mechanisms underlying the dysfunction of β -cells and other pancreatic islet endocrine cells, such as α , δ , and PP cells**. Attention was also drawn to the mechanisms of ER stress caused by the so-called „cytokine storm,” i.e., the massive and sudden release of cytokines and chemokines, cell inflammation, and their synergistic effect on the development of both T1D and T2D. The discussion also covered how various stressors—including viral infections, but also metabolic, immunological, and environmental factors—can affect β -cell homeostasis, leading to their dysfunction and even death.

It was emphasized that the COVID-19 pandemic has become a unique starting point for a broader view of metabolic disorders and diabetes in the context of systemic stress. It was noted that patients infected with SARS-CoV-2 frequently experienced metabolic decompensation and newly diagnosed diabetes, prompting researchers to further explore the links between acute inflammation and pancreatic function. However, the article is not limited to the effects of viral infection—it treats the pandemic as an analytical model for understanding a broader problem: **how do chronic inflammation and cellular stress affect the functioning and survival of pancreatic β -cells?**

The study showed that the receptors through which the SARS-CoV-2 virus enters cells – such as angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), neuropilin 1 (NRP1) and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) – are present not only in lung tissue but also in pancreatic cells ^{41–44}. The synthesis of these proteins in β -cells, as well as in other pancreatic islet cells – α , δ , PP, and ϵ – is particularly important, which may mean that the SARS-CoV-2 virus has the potential to cause complex disorders of the pancreatic islets of Langerhans ^{45–47} (**Figure 1, Article 1**).

Endoplasmic reticulum (ER) stress and loss of β -cell function

The article emphasizes that ER stress plays an important role in the pathogenesis of both T1D and T2D ^{48,49}. β -cells, due to their high secretory activity and the need to produce large amounts of proinsulin, are particularly sensitive to ER overload. An imbalance between the demand for protein synthesis and the cell's ability to properly fold and transport proteins leads to the activation of ER stress pathways.

The role of cytokines and inflammatory response in β -cell dysfunction

The inflammatory response plays an important role in pancreatic β -cell dysfunction in both T1D and T2D ⁵⁰. We have shown that during SARS-CoV-2 infection, as well as in chronic inflammation associated with metabolic syndrome, there may be increased production of cytokines and chemokines, leading to cellular stress and damage to pancreatic tissue.

In particular, based on the results of transcriptomics of infected primary human pancreatic islets, increased expression of many inflammatory factors has been demonstrated, such as interleukin 1 B (IL1B), interleukin 1 receptor antagonists (IL1RN), a number of chemokines such as chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), chemokines CCL3, CCL4 and CCL8, pro-inflammatory chemokines CXCL1/GRO α and CXCL2 and CXCL5, as well as interferons and genes related to cell signaling in response to viruses ^{51–53}. The increase in the expression of these factors was also confirmed by ELISA. Similar inflammatory activation was observed in models of ductal and acinar cells derived from hPSCs after SARS-CoV-2 infection ⁵⁴.

“Cytokine storm” and systemic effects

In the context of acute infections such as COVID-19, we discussed the phenomenon of the so-called “cytokine storm”, which can lead to damage to many organs, including the pancreas. It has been noted that in patients with severe COVID-19, inflammatory cell infiltration was observed in the pancreas, along with the presence of markers of endothelial inflammation (e.g., intercellular adhesion molecule 1, ICAM1; also known as CD54; Cluster of Differentiation 54), and elevated concentrations of selected chemokines, such as CXCL10 or CXCL11, in cultures of infected pancreatic islets ^{55–57}.

Although the article does not explicitly state that a “cytokine storm” leads to the development of diabetes, it suggests that it may be one of the factors contributing to the development of hyperglycemia or metabolic decompensation in individuals with previously diagnosed diabetes or specific metabolic predispositions ^{56,58}.

The effect of SARS-CoV-2 on different types of pancreatic cells

In addition to β -cells, the article also mentions the potential susceptibility of other types of islet cells—such as α -cells (producing glucagon), δ -cells (producing somatostatin), PP-cells (producing pancreatic polypeptide), and ϵ -cells (producing ghrelin)—to SARS-CoV-2 infection. It has been shown that the expression of viral receptors may vary in terms of both their levels and their distribution within the cell, which may underlie individual differences in the response of pancreatic cells to infection ^{59,60}.

The significance of immune cells and islet infiltrates

It should be emphasized that the autoimmune response plays an important role during diabetes, especially type 1 diabetes. Infiltration of pancreatic islets by immune cells, mainly T lymphocytes, can lead to direct destruction of β -cells. In T2D, although the process is not classically autoimmune in nature, inflammation is also observed within the islets, involving macrophages and other innate immune cells ^{11,61}.

In summary, it was indicated that β -cell dysfunction and survival are the result of a complex interaction of metabolic, inflammatory, and environmental factors. It was emphasized that both T1D and T2D are characterized by a common element—the progressive loss of β -cell ability to secrete insulin. The mechanisms underlying this process include ER stress, inflammatory stress, cytokine-induced cytotoxicity, lipotoxicity, and the potential impact of viral infections.

Therefore, it is suggested that future therapies should focus not only on glycemic control, but also on the protection and regeneration of β -cells – by reducing cellular stress, inhibiting pro-inflammatory cytokines, and supporting cellular adaptive mechanisms.

- 2) **Urbaniak E**, Henry S, Lalowski M, Borowiak M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Feb 20;13:1502469. doi: 10.3389/fcell.2025.1502469. PMID: 40052150; PMCID: PMC11882602 (Review article) ³².

The review paper focuses on the **process of insulin maturation in pancreatic β -cells, with particular emphasis on the stages and proteins involved in this process, along with their characteristics**. Proper protein folding is essential for protein functionality. Eukaryotic cells have developed complex mechanisms to control this process, including a network of chaperone proteins and a proteostasis system, which ensure proper protein maturation and maintain their active conformation ⁶². In the case of insulin, the hormone responsible for glucose homeostasis, disturbances in the folding and maturation process lead to its improper synthesis, accumulation of misfolded protein forms, and endoplasmic reticulum stress, which contributes to the development of diabetes ^{63,64}.

Insulin synthesis in pancreatic β cells begins with the production of preproinsulin, a molecule containing a signal peptide, the B chain, the C peptide, and the A chain ³¹. **Figure 2 (Article 2)** shows the signal sequence that directs preproinsulin to the ER, where it is cleaved to form proinsulin. A key step in proinsulin folding occurs in the ER, requiring spatial cross-linking through the formation of three stabilizing disulfide bridges between cysteine residues (Cys31–Cys96, Cys43–Cys109, Cys95–Cys100) ⁶⁵. This process is supervised and assisted by chaperone proteins such as BiP/GRP78 and GRP94, which prevent the aggregation of incorrectly folded molecules, and isomerases from the PDI family (e.g., protein disulfide isomerase), which catalyze the formation and reorganization of S–S bonds ⁶⁶. To maintain the continuity of disulfide bridge formation, PDI undergoes oxidation using the enzyme ERO1 oxidoreductase, generating hydrogen peroxide (H_2O_2), which is then detoxified by, among others, peroxiredoxin 4 (PRDX4) and glutathione peroxidase 7 (GPX7) ^{67,68} (**Figure 4, Article 2**).

In addition to disulfide bridges, the isomerization of the amino acid proline is also important in the formation of mature insulin, thanks to which the proinsulin structure adopts the preferred *trans* conformation. The FKBP2 protein is responsible for catalyzing this change, among others, and its synthesis is lowered in β -cells derived from T2D donors ³⁸. In further stages, correctly folded proinsulin undergoes further modifications, such as glycosylation, and is then packaged into COPII transport vesicles (with the participation of SAR1, SEC23,

SEC24, SEC13, and SEC31 proteins). These vesicles direct proinsulin from ER to the Golgi apparatus^{69,70}.

In the Golgi apparatus, proinsulin undergoes proteolytic processing catalyzed by an enzyme complex containing PC1/3 and PC2 convertases, which cleave the C-peptide, and carboxypeptidase E (CPE) that removes the remaining amino acid residues at the ends of the chains, leading to the formation of two final molecules: mature, fully functional insulin and C-peptide⁷¹. Mature insulin is stored in the form of stable hexamers (six insulin molecules bound by zinc ions) in secretory vesicles, from where it is released in response to glucose stimuli⁷². The secretion process itself occurs in two stages, the first being the rapid release from ready-made granules, and the second being the slower movement of insulin from the reserve pool⁷³.

Disorders in proinsulin folding may result from mutations in the *INS* gene (e.g., in Mutant INS-gene-induced Diabetes of Youth, MIDY), leading to amino acid changes at the protein level, such as: G(B8)V, Y(B26)C, L(A16)P, H(B5)D, V(B18)A), or in genes encoding chaperone proteins and ER proteins (WFS1, HSPA5, EIF2AK3, DNAJC3), as well as in genes encoding transport proteins such as GLUT2 or proteins of the SLC family^{74,75}. Abnormally folded insulin molecules accumulate and activate the ER stress response pathway, known as UPR, via “stress sensors” such as the endoplasmic reticulum protein kinase PERK, inositol-1-receptor-like protein 1 (IRE1), and transcription factor 6 (ATF6). PERK phosphorylates eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α), inhibiting translation and promoting the expression of activating transcription factor 4 (ATF4), which in turn activates the proapoptotic transcription factor, C/EBP homolog (CHOP). IRE1 activates XBP1, and ATF6, and after translocating to the nucleus, regulates the expression of genes that improve protein folding⁷⁶ (**Figure 3, Article 2**).

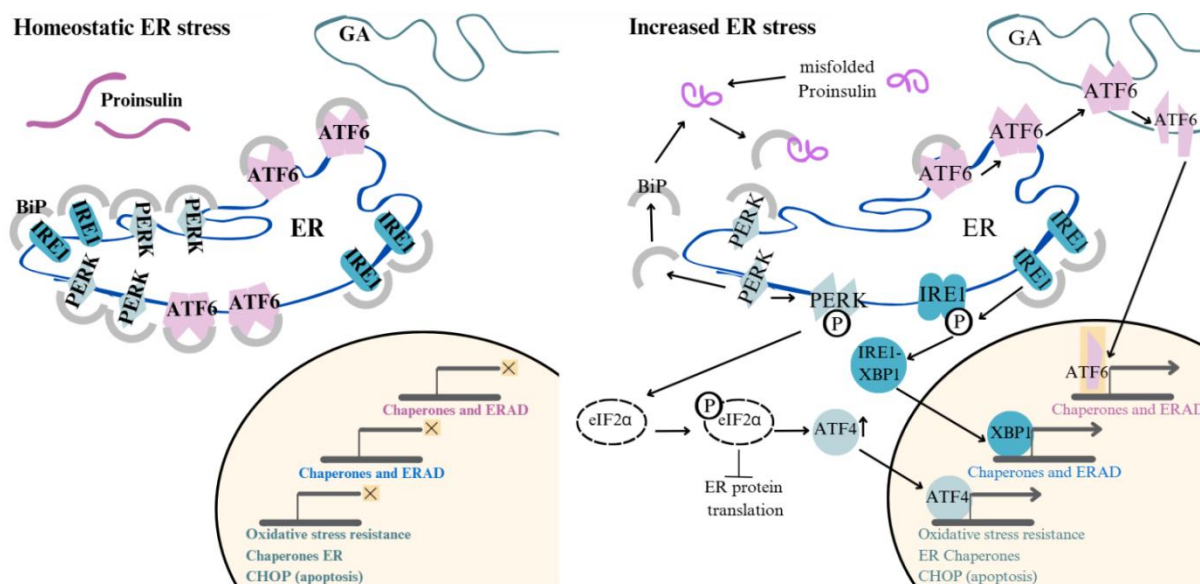


Figure 3. Schematic representation of the endoplasmic reticulum (ER) stress response.

Left panel - Under ER homeostasis, correctly folded proinsulin undergoes “quality control.” The chaperone protein BiP (binding immunoglobulin protein) binds to the three main ER stress “sensors” (IRE1, PERK, ATF6), keeping them in an inactive state. Right panel - Under conditions of elevated ER stress caused by improper proinsulin folding, BiP dissociates from the sensors, leading to activation of the PERK-eIF2α-ATF4, IRE1-XBP1, and ATF6 pathways. These factors stimulate the expression of chaperone proteins, components of the degradation machinery for misfolded proteins (ERAD), and genes involved in the oxidative stress response, while in the case of chronic stress also induce apoptosis. Based on Urbaniak *et al.*, **Article 2**.

Chronic ER stress, resulting from disturbances in the proinsulin folding process, is a key pathogenic factor leading to dysfunction and apoptosis of pancreatic β -cells, which in turn contributes to the progression of diabetes. Understanding the mechanisms underlying this pathology is fundamental to the development of new therapeutic strategies. Prolonged stress on the biosynthetic apparatus of β -cells, caused by the accumulation of misfolded proinsulin, initiates a cascade of destructive events. Excessive activation of the UPR pathway leads to a shift in its function from adaptive to proapoptotic. Under conditions of uncompensated stress, instead of restoring cellular homeostasis, UPR mechanisms activate signaling pathways leading to programmed cell death (apoptosis)^{63,66}. This process results in a gradual loss of functional β -cell mass.

Aggregation of misfolded proinsulin molecules can result in the formation of amyloid deposits. These are structures rich in β -sheets, resistant to proteolytic degradation, and are one of the characteristic changes in pancreatic pathology in people with T2D⁷⁷. The accumulation of amyloid deposits leads to disturbances in the normal physiology of β -cells.

Amyloid deposits can accumulate in target tissues such as the liver or skeletal muscles, where they disrupt insulin signal transduction, exacerbating systemic insulin resistance ⁷⁸.

Currently developed therapeutic strategies for diabetes are based on improving ER homeostasis, supporting protein folding, and gene therapies targeting key proteins in the insulin synthesis and maturation pathway ^{79,80}. In addition, so-called chemical chaperones are being developed, which are small molecules that help proinsulin adopt the correct shape. Drugs that reduce ER stress are also being tested.

In summary, proinsulin folding is an extremely complex and energy-intensive process. The high rate of insulin synthesis, reaching 6,000 preproinsulin molecules per second per β -cell, places a huge metabolic burden on the ER ^{64,81}. This makes β cells particularly susceptible to proteostasis disorders. **When the folding process is disrupted, there is a reduction in the amount of properly folded, functional insulin, activation of ER stress, and, consequently, β -cell death and progression of diabetes.** Understanding the molecular mechanisms regulating insulin folding and maturation paves the way for new therapies, both pharmacological and cellular, that may contribute to more effective treatment of T1D and T2D in the future.

3) Urbaniak E, Baginska M, Szlachcic W, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec M, and Borowiak M. ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9 *BioRxiv* 2025.09.01.672695. doi: 10.1101/2025.09.01.672695 (preprint) ⁸².

Previous studies in which I participated demonstrated FKBP2 synthesis in human β cells *in vivo* ³⁸. Based on these results, we analyzed FKBP2 synthesis in the adult human pancreas in detail. Immunofluorescence staining and confocal microscopy confirmed the presence of FKBP2 in most insulin-producing cells, while δ -cells, which produce somatostatin, only sporadically showed the presence of this protein (**Figure 1A, Article 3**). Some glucagon-producing α -cells also showed immunoreactivity with antibodies recognizing FKBP2 (**Figure S1A, Article 3**). In parallel, analysis of single-cell RNA sequencing data from the adult human pancreas revealed the presence of **FKBP2** transcript in endocrine cells, including β -cells ⁸³ (**Figure S1B, Article 3**).

To investigate the role of FKBP2 in human β -cell development, we used a model of targeted *in vitro* differentiation of hPSCs, based on previously established protocols ^{20,21,84}. This process involved sequential passage of cells through successive developmental stages: DE, PP, EP, until β -cells were obtained (**Figure 2, Introduction paragraph**). Immunofluorescence staining and flow cytometry, methods visualizing markers specific to successive stages, such as OCT3/4 (hPSCs), FOXA2 (DE), PDX1 and NKX6.1 (PP), chromogranin A (CHGA, EP), C-peptide (C-PEP), and insulin and NKX6.1 confirmed the formation of β -cells (**Figures 1B and S1C, Article 3**).

Analysis of publicly available single-cell RNA sequencing data from the β -cell differentiation process indicated mRNA expression for *FKBP2* in EP cells and β -cells. Immunofluorescence staining and Western blot analysis revealed the presence of increased FKBP2 protein starting from the EP stage, and its synthesis persisted in β -cells (expressing CHGA and INS) at both the early (day 21) and late (day 31) stages of differentiation (**Figures 1C and S1E–F, Article 3**). Together, these data indicate that *FKBP2* transcript and protein are synthesized during differentiation toward endocrine β -cells *in vitro*.

The effect of *FKBP2* deletion on insulin processing and secretion

To investigate the function of FKBP2 in β -cells, we generated hPSCs with *FKBP2* gene deletion (FKBP2 KO) using CRISPR-Cas9 (**Figure 1D, Article 3**). The efficacy of genetic

modification at the DNA level was confirmed by PCR (**Figure S1G, Article 3**) and Sanger sequencing (**Figure S1H, Article 3**). The absence of FKBP2 protein synthesis was verified by Western blot (**Figure 1E and S1I, Article 3**) and immunofluorescence staining (**Figure 1F, Article 3**). It was found that the deletion of the *FKBP2* gene did not affect the synthesis of pluripotency markers such as OCT3/4 and NANOG (**Figure S1K, Article 3**).

Insulin levels decreased by 70% with unchanged proinsulin levels in the FKBP2-KO line differentiated into β -cells. In addition, accumulation of C-PEP was visible (**Figure 1H-I, Article 3**). Using the Tet-On system, we obtained induced synthesis of FKBP2-FLAG protein, which led to increased synthesis of CHGA, C-PEP, and INS proteins following the use of doxycycline activating *FKBP2* gene overexpression in this system (**Figures 1J-K and S1M-O, Article 3**).

The consequence of proinsulin processing disorders was a 42% reduction in the secretory capacity of FKBP2 KO cells in response to KCl stimulation (**Figure 1L, Article 3**). Ultrastructural analysis of cells using SIM and TEM microscopy revealed significant changes in the morphology of insulin granules. In KO cells, they were enlarged by an average of 15% (**Figure 1M, Article 3**), which was confirmed by quantitative analysis of TEM images (**Figure 1N, Article 3**). Increased heterogeneity and electron density of granules were also observed, indicating defects in their proper maturation. The results obtained prove that FKBP2 plays an important role in the regulation of proinsulin processing and insulin granule maturation in β -cells.

Single-cell RNA sequencing reveals changes in β -cell differentiation and function following *FKBP2* deletion

Analysis of scRNA-seq data performed on day 31 of differentiation revealed the presence of seven cell clusters in both control (WT) and KO conditions (**Figure 2A–B, Article 3**). In KO cells, a reduction in the number of PP2 and EP2 clusters and an increased representation of cells in EP1 clusters and in the early α -cell population were observed (**Figure 2C, Article 3**). A key observation was an approximately 1.5-fold reduction in the number of β -cells. Analysis of the transcriptional profile within the β -cell cluster revealed a partial loss of their specific molecular identity. In KO β -cells, increased synthesis of markers characteristic of α cells (GCG, ETV1) and decreased synthesis of INS, HDAC9, and PPIB were observed (**Figures 2D and 2F, Article 3**).

Analysis of signal pathway enrichment (GO and KEGG) showed decreased expression of genes related to protein folding and ER function. In contrast, genes involved in cell adhesion, cytoskeletal organization, and calcium ion response were overexpressed (**Figure 2E, Article 3**). Detailed analysis showed reduced transcript levels for *PCSK1* (encoding prohormone convertase PC1/3), a key endopeptidase that initiates the proteolytic maturation of proinsulin. This change was accompanied by an increase in the synthesis of carboxypeptidase E (CPE), which participates in the final stages of insulin processing, and p115 protein, which plays an important role in vesicular transport between the ER and the Golgi apparatus. These data suggest that in response to defects in proinsulin folding and processing, β -cells activate compensatory mechanisms involving the activation of alternative maturation and transport pathways to partially compensate for proteostasis disorders.

Increased ER stress in β -cells with *FKBP2* deficiency

Immunofluorescence staining revealed increased synthesis of ATF6 and PERK proteins – classic markers of the UPR – in KO β -cells (**Figure 3A, Article 3**). Increased levels of ATF6 and PERK in the cell indicate the activation of the main UPR signaling pathways responsible for restoring endoplasmic reticulum homeostasis through increased chaperone protein synthesis, translation retardation, and activation of misfolded protein degradation. At the same time, a reduced level of SERCA2, a calcium pump that maintains the correct concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum, was found, which correlated with increased intracellular calcium concentration (**Figure 3B and 3D, Article 3**). Calcium homeostasis perturbations further exacerbated ER stress, creating a self-perpetuating mechanism. Based on the above observations, we concluded that *FKBP2* deficiency leads to abnormal proinsulin folding. This initiates a pathological cascade of events, including ER stress activation and calcium homeostasis disarray, which mutually reinforce each other. Consequently, insulin secretion is impaired, which may contribute to β -cell dysfunction and impaired glucose tolerance (**Figure 3E, Article 3**).

***FKBP2* regulates α - and β -cell fate**

Analysis of publicly available scRNA-seq data from the human fetal pancreas showed a systematic increase in *FKBP2* transcript expression between the 4th and 11th weeks of development (**Figure 4A, Article 3**). Immunofluorescence staining confirmed the presence of *FKBP2* in both developing pancreatic epithelial cells and C-PEP-positive cells. This indicates

the potential activity of FKBP2 during the formation of endocrine cells *in vivo* (**Figure 4B, Article 3**).

To investigate the functional significance of FKBP2 in the differentiation process, cells with *FKBP2* gene deletion (KO) were analyzed. At the PP stage, no changes in NKX6.1 protein synthesis were observed, but eight days later, reduced levels of key regulators of further differentiation and stabilization of the secretory cell phenotype, PDX1 and NKX6.1 proteins, were observed in KO cells. Additionally, analysis of INSM1 synthesis, an early and transitional marker of endocrine progenitors, revealed significantly elevated levels in KO cells. These results indicate abnormalities in the differentiation process already at an early stage of secretory cell development (**Figure 4C-F, Article 3**).

The results of scRNA-seq analysis performed on day 21 of differentiation showed an increased abundance of the EP2 population and all types of secretory cells under KO conditions (**Figure 4H-I, Article 3**). This suggests that the absence of FKBP2 leads to accelerated differentiation of endocrine progenitors, which occurs at the expense of their proper maturation and cell identity stabilization. Increased synthesis of INSM1 protein, combined with decreased levels of PDX1 and NKX6.1, further supports this hypothesis, indicating an imbalance between proliferation, differentiation, and maturation of secretory cells under conditions of *FKBP2* deficiency.

Disruptions in HDAC9 expression and synthesis and its dependence on NFAT2

Interestingly, one of the most dysregulated genes identified in the scRNA-seq analysis of β -cells under KO conditions was *HDAC9*, whose expression changed twofold (**Figure 2D, Article 3**). HDAC9, belonging to class IIa histone deacetylases, is synthesized in pancreatic β -cells, and *Hdac9*^{-/-} knockout mice show increased β -cell mass³⁰. On day 21 of differentiation, elevated levels of *HDAC9* mRNA were found in EP2 cells of the KO line (**Figure 6A-B, Article 3**). However, on day 31 of differentiation, *HDAC9* mRNA levels were significantly reduced in these populations, which may be part of a compensatory response following *FKBP2* gene deletion (**Figure 6D-E, Article 3**). However, immunofluorescence staining showed a threefold (day 21) and 2.5-fold (day 31) increase in HDAC9 protein levels in β -cells in KO (**Figures 6C and 6F, Article 3**). SIM microscopy confirmed the nuclear localization of HDAC9 protein in both control (WT) and KO cells, suggesting that increased HDAC9 synthesis may be associated with increased transcriptional activity (**Figure 6G,**

Article 3). The functional role of HDAC9 was confirmed by its inhibition using the selective inhibitor TMP195. This intervention in the EP population led to a slowdown in differentiation towards α -cells and an increase in insulin synthesis (**Figure 6J-K, Article 3**), indicating the involvement of HDAC9 in the modulation of endocrine cell differentiation. Furthermore, induction of ER stress using DTT resulted in increased synthesis of ATF6 and HDAC9 proteins (**Figure 6H-I, Article 3**), revealing a potential mechanism linking UPR activation to HDAC9 regulation.

The loss of chaperone protein (FKBP2) in the ER, resulting in elevated HDAC9 levels in KO cells, was functionally linked by us to the dysregulation of transcriptional mechanisms. To identify potential regulators of HDAC9 gene transcription, we used the EnrichR TFs_TRANSFAC_JASPAR database for *in silico* analysis. Analysis of the results showed that HDAC9 can be activated by the transcription factor NFATC1 (NFAT2). A potential NFAT2-binding motif is localized in the *HDAC9* promoter sequence. Enrichment analysis of “transcription motifs” (sequences binding a given transcription factor; **Figure 7A-7B, Article 3**) revealed disturbances in cellular pathways regulated by NFAT2, with no differences in its expression. Further analysis of the results showed that under KO conditions, the sequences recognized by NFAT2 occur in smaller numbers, indicating a reduction in the activity of transcription networks dependent on this factor. The NFAT family are transcription factors whose activity depends on the oscillation of intracellular calcium concentration, and their function is crucial in controlling the expression of genes related to β -cell activity, including genes responsible for glucose regulation and insulin secretion in mice ^{85–87}. In line with the above results, immunofluorescence staining revealed increased NFAT2 protein content in β -cells in KO, with its predominant localization in the cell nucleus indicating a transcriptionally active form (**Figures 7C and 7E, Article 3**). The observed nuclear accumulation of NFAT2 suggests its transcriptional activity, possibly induced by Ca^{2+} influx caused by ER stress. An important confirmation of this hierarchy in the signaling pathway was the pharmacological inhibition of HDAC9, which had no effect on NFAT2 levels, clearly positioning NFAT2 as a factor located upstream to HDAC9 (**Figures 7F-G, Article 3**).

To confirm that the observed mechanism is a consequence of FKBP2 loss in mature cells and not a result of developmental disorders, we created an inducible iKO FKBP2 model in hPSCs, detailed in **Figure S7A (Article 3)**. In this system, Cas9 expression is activated by doxycycline, enabling time-controlled deletion of FKBP2 during differentiation into β -cells.

Preliminary characterization of the model showed that iKO induction, which was performed **at the stage when differentiated cells had reached the β -cell phenotype**, did not affect the synthesis of key endocrine progenitor markers such as PDX1, CHGA, or INSM1, or on HDAC9 levels at the early stage of differentiation (**Figure S7B-C, Article 3**). These data confirm that the iKO system allows for selective study of FKBP2 function without disrupting endocrine differentiation mechanisms.

Immunofluorescence analyses confirmed the absence of FKBP2 in iKO cells (**Figure 7J-K, Article 3**) and revealed statistically significant increases in ATF6, NFAT2, GCG, and C-PEP levels (**Figure 7L-M, Article 3**). These results clearly indicate activation of the ER stress response, increased NFAT2 activity, and a shift in the differentiation axis towards α -cells.

Based on the data obtained, we developed a mechanistic diagram (**Figure 7H, Article 3**), **according to which the loss of *FKBP2* leads to increased ER stress, an increase in Ca^{2+} ion concentration, and activation of the calmodulin- and calcineurin-dependent pathway, resulting in the nuclear localization and activation of NFAT2. This ultimately leads to the dysregulation of target genes transcription, including *HDAC9*, whose excessive activity promotes the reprogramming of endocrine progenitors towards other secretory cells (pro- α differentiation axis).**

9. Dyskusja

Zrozumienie szczegółowych etapów fałdowania proinsuliny oraz identyfikacja kluczowych białek biorących udział w tym procesie stanowi istotny element badań nad patofizjologią cukrzycy typu 2 (T2D). Coraz więcej dowodów wskazuje, że błędy w fałdowaniu proinsuliny w ER odgrywają fundamentalną rolę w utracie funkcji komórek β . W prezentowanej rozprawie doktorskiej skoncentrowano się na analizie funkcji FKBP2 – izomerazy peptydyloprolyl cis-trans zlokalizowanej w ER – której rola w procesie dojrzewania proinsuliny nie została dotychczas w pełni wyjaśniona.

Wcześniejsze dane, m.in. z pracy Hoefner i wsp. (2023), wykazały, że FKBP2 występuje w komórkach β i oddziałuje z niesfałdowaną proinsuliną oraz białkami opiekuńczymi GRP94 i BiP. Delecja *FKBP2* w modelu szczurzym (INS-1E) prowadzi do zaburzenia procesowania proinsuliny, wzrostu jej wydzielania poza komórkę w formach niedojrzałych oraz skrócenia czasu półtrwania cząsteczki. Mutacja P28A w proinsulinie, zlokalizowana w miejscu rozpoznawanym przez FKBP2, eliminowała zdolność tego białka opiekuńczego do przywrócenia poprawnego fałdowania, co potwierdziło jego kluczową funkcję w tym procesie ³⁸.

Aby rozszerzyć te obserwacje na system ludzkich komórek, wykorzystano trzy modele oparte na ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych (hPSC): klasyczny knock-out (KO), nadekspresję genu *FKBP2* oraz model z indukowaną delecją genu *FKBP2* (iKO).

W modelu KO, delecja *FKBP2* została wprowadzona metodą CRISPR/Cas9 przed rozpoczęciem procesu różnicowania komórek. Pozwoliło to na obserwację skutków trwałego braku tego genu/białka w całym procesie różnicowania. Analiza fenotypowa wykazała, że mimo poprawnego przejścia przez wczesne etapy rozwojowe (DE i PP), w późniejszych etapach – szczególnie na poziomie endokrynnym – komórki wykazywały istotne zaburzenia. Odnotowano obniżoną ekspresję insuliny oraz zmniejszoną liczebność komórek β . Immunofluorescencja i cytometria przepływowa wykazały także obniżoną syntezę kluczowych markerów dojrzewania, takich jak PDX1 i NKX6.1. Ponadto, zaobserwowano podwyższony stosunek ilościowy proinsuliny do insuliny, akumulację C-peptydu oraz zaburzenia w morfologii i wielkości ziaren wydzielniczych, co potwierdzono za pomocą mikroskopii SIM i TEM. Zaburzenia te szły w parze z istotnym spadkiem wydzielania insuliny, wskazując na defekt funkcjonalny komórek β . Wyniki te są spójne z wcześniejszymi

obserwacjami przez Hoefner i wsp.³⁸ w modelu szczurzym, wskazując na ewolucyjnie konserwowaną funkcję FKBP2 w fałdowaniu i przetwarzaniu proinsuliny. W przypadku modelu OE (nadekspresja *FKBP2*), obserwowano efekt odwrotny niż w KO – komórki charakteryzowały się podwyższoną syntezą INS niż komórki kontrolne (WT). Analizy immunofluorescencyjne i potwierdziły podwyższony poziom markerów dojrzewania, takich CHGA oraz NKX6.1. Wyniki te wskazują, że nadekspresja *FKBP2* wspomaga prawidłowe fałdowanie proinsuliny oraz sprzyja dojrzewaniu i funkcjonalności komórek β .

Dalsze analizy mechanistyczne dotyczyły porównania modeli KO i WT, aby wyjaśnić źródło obserwowanych zaburzeń. Aby lepiej zrozumieć molekularne podstawy fenotypu obserwowanego w modelu KO (w porównaniu do kontroli WT), wykonano sekwencjonowanie pojedynczych komórek oraz analizy immunofluorescencyjne. Badania te wykazały redukcję liczby komórek β oraz wzrost liczby komórek α (wraz z ekspresją glukagonu, GCG oraz czynnika transkrypcyjnego ARX, ang. *aristaless related homeobox*), co wskazuje na przesunięcie linii rozwojowej. Równolegle obserwowano wzrost syntezy markerów odpowiedzi na stres ER (ATF6, PERK), obniżenie poziomu SERCA2 oraz zwiększenie stężenia wapnia cytoplazmatycznego. Wzrost aktywności osi wapń–NFAT2–HDAC9 sugeruje aktywację szlaku epigenetycznego, który może odpowiadać za reprogramowania losu komórek. Zwiększony poziom HDAC9 został potwierdzony metodami IF i SIM na poziomie białka. Aktywna, jądrowa lokalizacja NFAT2, potwierdzona także barwieniem immunofluorescencyjnym, korelowała ze zwiększoną syntezą HDAC9. Zastosowanie inhibitora TMP195 prowadziło do redukcji liczby komórek α i częściowego przywrócenia syntezy INS, co potwierdza funkcjonalną rolę szlaku NFAT2–HDAC9 w warunkach stresu ER.

Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami opisującymi plastyczność komórek β w warunkach stresu, np. pracami Avrahami i wsp.⁸⁸, Talchai i wsp.⁸⁹ i Sachdeva i wsp.^{90,91}, które wskazują na możliwość epigenetycznej rewersji fenotypu komórek β . **Nasze wyniki stanowią rozszerzenie tych obserwacji, wskazując na FKBP2 - jako kluczowy stabilizator fenotypu komórek β i regulator odpowiedzi na stres ER.**

W tym kontekście istotne jest podkreślenie, że funkcja FKBP2 może wykraczać poza klasyczne zadania przypisane białkom opiekuńczym. Coraz więcej badań^{92,93} wskazuje, że członkowie rodziny FKBP biorą udział także w regulacji sygnalizacji mTOR, kontroli wapniowej oraz procesach autofagii. W komórkach β , FKBP2 może pełnić rolę integrującą

łącząc lokalną proteostazę w ER z globalnym stanem metabolicznym, działając jako „czynnik sprzęgający” defekty w fałdowaniu białek z adaptacją całej komórki.

Aby lepiej rozdzielić wpływ FKBP2 na sam proces dojrzewania proinsuliny od jego roli w różnicowaniu komórkowym, opracowano model iKO - indukowalny knock-out wykorzystujący system Tet-On i integrację kasety sgRNA w lokusie piggyBac. Konstruktor zawierał rozdzielone motywem tRNA sekwencje sgRNA, umożliwiające ich ekspresję jako jeden transkrypt ulegający auto-wycinaniu. Indukcja delekcji *FKBP2* następowała w 20-tym dniu różnicowania, po etapie PP, ale przed pełnym różnicowaniem endokrynnym. Taki układ pozwala na selektywne wyłączenie *FKBP2* tylko w końcowej fazie dojrzewania komórek β .

W przeciwieństwie do modelu KO, w iKO nie odnotowano zaburzeń w syntezie PDX1, CHGA, INSM1, co sugeruje, że FKBP2 bierze udział nie tylko w odpowiednim procesowaniu proinsuliny, ale również odgrywa rolę w dojrzewaniu komórek β trzustki.

Z perspektywy translacyjnej, modele KO oraz iKO pozwalają na rozdzielenie funkcji FKBP2 w fałdowaniu insuliny i różnicowaniu linii endokrynnych. Otwiera to nowe możliwości terapeutyczne: zastosowanie chaperonów chemicznych (np. 4-PBA, TUDCA), modulatorów wapnia (SERCA2), czy inhibitorów HDAC9, co może poprawić jakość i stabilność komórek β . Co więcej, FKBP2 może posłużyć jako biomarker selekcji najbardziej funkcjonalnych linii hPSC dla celów terapii komórkowej. Warto jednak zauważyć, że interwencje te mogą mieć charakter pleiotropowy – podczas gdy wspomagają fałdowanie i przeżywalność komórek β , mogą także modulować inne linie komórkowe wysp trzustki. Dlatego przyszłe badania powinny uwzględniać heterogeniczność wysp i odpowiedzieć na pytanie czy FKBP2 pełni różne funkcje w subpopulacjach komórek β ^{94,95}.

Dalsze badania powinny objąć analizę interaktomu FKBP2, wykorzystując metody takie jak immunoprecypitacja sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *Immunoprecipitation–Mass Spectrometry*, IP-MS)⁹⁶, celem zidentyfikowania jego partnerów w ER i ustalenia pozycji w kaskadzie proteostazy. Porównania z innymi członkami rodziny FKBP – FKBP10, FKBP51 i FKBP52 – może ujawnić redundancję lub specjalizację funkcjonalną tych białek w komórkach o wysokiej aktywności wydzielniczej.

Dodatkowym kierunkiem badań powinna być analiza powiązań między stresem ER a mitochondriami (ang. *mitochondrial-ER crosstalk*)^{97,98}. Zaburzenie funkcji FKBP2 może być przyczyną upośledzonego funkcjonowania błon mitochondrialnych (ang. *mitochondria-*

associated membranes, MAMs), które odpowiadają za wymianę wapnia i lipidów. Dysfunkcja tych połączeń funkcjonalnych może potęgować stres oksydacyjny i prowadzić do utraty wydajności komórek β , co stanowi kolejny mechanizm wiążący FKBP2 z patogenezą T2D.

Podsumowując, FKBP2 pełni złożoną rolę w komórkach β : 1) jako chaperon fałdujący proinsulinę, modulator odpowiedzi na stres ER, 2) regulator wapniowy i epigenetyczny oraz stabilizator fenotypu komórek β , 3) modele KO oraz iKO oparte na hPSC stanowią zaawansowaną platformę do badania homeostazy ER i testowania przyszłych terapii ukierunkowanych na poprawę funkcji komórek β w T2D, 4) integracja tych wyników z wynikami badań populacyjnych u ludzi (np. GWAS) może pozwolić na identyfikację wariantów w genie *FKBP2* związanych z podatnością na T2D, bardziej uwypuklając translacyjny charakter tego białka jako biomarkera i obiektu celowanych terapii w cukrzycy.

Discussion

Understanding the detailed stages of proinsulin folding and identifying the key proteins involved in this process is an important part of research into the pathophysiology of T2D. There is growing evidence that errors in proinsulin folding in the ER play a fundamental role in the loss of β -cell function. This doctoral dissertation focuses on the analysis of the function of FKBP2, a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase located in the ER, whose role in proinsulin maturation has not yet been fully elucidated.

Previous data, including from the work of Hoefner *et al.* (2023), have shown that FKBP2 is present in β -cells and interacts with unfolded proinsulin and the chaperone proteins GRP94 and BiP. Deletion of *FKBP2* in a rat model (INS-1E) leads to impaired proinsulin processing, increased secretion of immature forms outside the cell, and a shortened half-life of the molecule. The P28A mutation in proinsulin, located at the site recognized by FKBP2, eliminated the ability of this chaperone protein to restore correct folding, confirming its key role in this process ³⁸.

To extend these observations to a human cell system, three models based on human pluripotent stem cells (hPSCs) were used: classic knockout (KO), *FKBP2* gene overexpression, and an inducible *FKBP2* gene knockout (iKO) model.

In the KO model, *FKBP2* deletion was introduced using the CRISPR/Cas9 method before the start of the cell differentiation process. This allowed the effects of the permanent absence of this gene/protein to be observed throughout the whole differentiation process. Phenotypic analysis showed that despite correctly passing through the early developmental stages (DE and PP), the cells exhibited significant abnormalities in later stages, particularly at the endocrine level. Reduced INS expression and decreased β -cell numbers were noted. Immunofluorescence and flow cytometry also showed reduced synthesis of key maturation markers such as PDX1 and NKX6.1. In addition, an increased proinsulin to insulin ratio, C-peptide accumulation, and abnormalities in the morphology and size of secretory granules were observed, as confirmed by SIM and TEM microscopy. These abnormalities were accompanied by a significant decrease in insulin secretion, indicating a functional defect in β -cells. These results are consistent with earlier observations by Hoefner *et al.* ³⁸ in a rat model, indicating an evolutionarily conserved function of FKBP2 in proinsulin folding and processing. In the OE model (*FKBP2* overexpression), the opposite effect was observed compared to KO – cells were characterized by increased INS synthesis compared to control cells (WT). Immunofluorescence analyses confirmed elevated levels of maturation markers

such as CHGA and NKX6.1. These results indicate that *FKBP2* overexpression promotes proper proinsulin folding and favors β -cell maturation and functionality.

Further mechanistic analyses compared KO and WT models to explain the source of the observed abnormalities. To better understand the molecular basis of the phenotype observed in the KO model (compared to the WT control), single-cell RNA sequencing and immunofluorescence analyses were performed. These studies showed a reduction in the number of β -cells and an increase in the number of α -cells (along with the expression of glucagon, GCG, and the transcription factor ARX, *aristaless related homeobox*), indicating a shift in the developmental lineage. At the same time, an increase in the synthesis of ER stress response markers (ATF6, PERK), a decrease in SERCA2 levels, and an increase in cytoplasmic calcium concentration were observed. The increase in calcium-NFAT2-HDAC9 axis activity suggests the activation of an epigenetic pathway that may be responsible for the cell fate reprogramming cycle. Increased HDAC9 levels were confirmed by IF and SIM methods at the protein level. The active nuclear localization of NFAT2, also confirmed by immunofluorescence staining, correlated with increased HDAC9 synthesis. The use of the TMP195 inhibitor led to a reduction in the number of α -cells and partial restoration of INS synthesis, confirming the functional role of the NFAT2–HDAC9 pathway under ER stress conditions.

These observations are consistent with earlier reports describing the plasticity of β -cells under stress conditions, e.g., the work of Avrahami *et al.* ⁸⁸, Talchai *et al.* ⁸⁹ and Sachdeva *et al.* ^{90,91}, which indicate the possibility of epigenetic reversal of the β -cell phenotype. **Our results extend these observations, pointing to FKBP2 as a key stabilizer of the β -cell phenotype and regulator of the ER stress response.** In this context, it is important to emphasize that the function of FKBP2 may extend beyond the classic tasks assigned to chaperone proteins. A growing number of studies ⁹³ indicate that members of the FKBP family are also involved in the regulation of mTOR signaling, calcium control, and autophagy processes. In β -cells, FKBP2 may play an integrative role by linking local proteostasis in the ER to the global metabolic state, acting as a “coupling factor” between protein folding defects and whole-cell adaptation.

To better separate the influence of FKBP2 on the proinsulin maturation process itself from its role in cell differentiation, an iKO model was developed—an inducible knock-out using the Tet-On system and integration of the sgRNA cassette into the piggyBac locus. The construct contained sgRNA sequences separated by a tRNA motif, allowing their expression as a single self-splicing transcript. Induction of *FKBP2* deletion occurred on day 20 of differentiation,

after the PP stage but before full endocrine differentiation. This arrangement allows for selective *FKBP2* knockout only in the final phase of β -cell maturation.

In contrast to the KO model, no abnormalities in PDX1, CHGA, or INSM1 synthesis were observed in iKO, suggesting that FKBP2 is not only involved in the proper processing of proinsulin but also plays a role in the maturation of pancreatic β -cells.

From a translational perspective, KO and iKO models allow for the separation of FKBP2 functions in insulin folding and endocrine line differentiation. This opens new therapeutic possibilities: the use of chemical chaperones (e.g., 4-PBA, TUDCA), calcium modulators (SERCA2), or HDAC9 inhibitors, which may improve the quality and stability of β -cells. Furthermore, FKBP2 can serve as a biomarker for selecting the most functional hPSC lines for cell therapy purposes. However, it is worth noting that these interventions may be two-sided – while they support β -cell folding and survival, they may also modulate other pancreatic islet cell lines. Therefore, future studies should take into account the heterogeneity of the islets and answer the question of whether FKBP2 performs different functions in β -cell subpopulations^{94,95}.

Further research should include analysis of the FKBP2 interactome using methods such as immunoprecipitation coupled with mass spectrometry (IP-MS)⁹⁶, to identify its partners in the ER and determine its position in the proteostasis cascade. Comparisons with other members of the FKBP family – FKBP10, FKBP51, and FKBP52 – may reveal redundancy or functional specialization of these proteins in cells with high secretory activity.

An additional direction of research should be the analysis of the links between ER stress and mitochondria (mitochondrial-ER crosstalk)^{97,98}. FKBP2 dysfunction may result in an impaired function of mitochondria-associated membranes (MAMs), which are responsible for calcium and lipid exchange. Imbalance in these functional connections can increase oxidative stress and lead to loss of β -cell efficiency, which is another mechanism linking FKBP2 to the pathogenesis of T2D.

In summary, FKBP2 plays a complex role in β -cells: 1) as a proinsulin folding chaperone, modulator of ER stress response, 2) calcium and epigenetic regulator and β -cell phenotype stabilizer, 3) hPSC-based KO and iKO models provide an advanced platform for studying ER homeostasis and testing future therapies aimed at improving β -cell function in T2D, 4) the integration of these results with human population studies (e.g., GWAS) may allow the identification of variants in the *FKBP2* gene associated with susceptibility to T2D, further highlighting the translational nature of this protein as a biomarker and aim for targeted therapies in diabetes.

10. Wnioski

- 1) Białko *FKBP2* jest syntezowane w ludzkich komórkach β trzustki, zarówno w trakcie rozwoju płodowego, jak i w dorosłej trzustce. Jego obecność koreluje z obecnością markerów endokrynnych.
- 2) Całkowita delecja *FKBP2* (KO) w komórkach hPSC prowadzi do istotnych zaburzeń w przetwarzaniu proinsuliny, zmniejszonej ilości dojrzałych ziarnistości insulinowych oraz upośledzonej sekrecji insuliny.
- 3) Nadekspresja *FKBP2* (OE) wywołuje efekt odwrotny – pobudza syntezę markerów dojrzałości komórek β oraz poprawia produkcję insuliny, co sugeruje, że *FKBP2* jest czynnikiem wspomagającym dojrzewanie komórek β .
- 4) Użycie indukowanego knockoutu (*iKO*) umożliwia kontrolowaną delecję genu *FKBP2* i pozwala na czasowe rozdzielenie ról odgrywanych przez gen/białko *FKBP2* na wczesnych i późnych etapach różnicowania.
- 5) W warunkach KO obserwuje się aktywację stresu siateczki śródplazmatycznej (ER), co potwierdzają podwyższone poziomy PERK, ATF6 oraz wzrost poziomu cytoplazmatycznego wapnia (obniżony poziom białka SERCA2).
- 6) Analizy ultrastrukturalne wykazały istotne defekty w budowie ziarnistości wydzielniczych w komórkach β pozbawionych *FKBP2*, co może tłumaczyć ich zaburzoną funkcję wydzielniczą.
- 7) Sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek ujawniło, że delecja *FKBP2* zaburza trajektorię różnicowania komórek w kierunku fenotypu β , a populacja staje się bardziej heterogenna, z większym udziałem komórek α .
- 8) HDAC9 jest syntezowany w komórkach z delecją *FKBP2*, a jego lokalizacja w komórce zlokalizowana jest głównie jądrze komórkowym. Zwiększona synteza białka koreluje ze spadkiem syntezy kluczowego markera dojrzałości komórek β , co wskazuje, że HDAC9 pełni funkcję represora różnicowania i dojrzewania tych komórek.
- 9) Interwencja farmakologiczna hamująca funkcję HDAC9 częściowo przywraca syntezę markerów dojrzałości komórek β , co wskazuje na potencjalne zastosowanie tej strategii w celu odwrócenia zaburzeń w różnicowaniu komórek β w warunkach stresu ER.
- 10) Indukcja stresu ER z użyciem DTT potwierdziła, że *FKBP2* działa ochronnie wobec komórek β .

Conclusions

- 1) **The FKBP2 protein is synthesized in human pancreatic β -cells, both during fetal development and in the adult pancreas.** Its presence correlates with the presence of endocrine markers.
- 2) **Complete deletion of *FKBP2* (KO) in hPSC cells leads to significant disturbances in proinsulin processing,** reduced amounts of mature insulin granules and impaired insulin secretion.
- 3) **FKBP2 (OE) overexpression has the opposite effect – it stimulates the synthesis of β -cell maturity markers and improves insulin production,** suggesting that FKBP2 is a factor that promotes β -cell maturation.
- 4) **The use of induced knockout (iKO) enables controlled deletion of the *FKBP2* gene** and allows for the temporary separation of the roles played by the FKBP2 gene/protein in the early and late stages of differentiation.
- 5) **Under KO conditions, endoplasmic reticulum (ER) stress activation is observed,** as confirmed by elevated levels of PERK, ATF6, and increased cytoplasmic calcium levels (decreased SERCA2 protein levels).
- 6) **Ultrastructural analyses revealed significant defects in the structure of secretory granules in β -cells lacking FKBP2,** which may explain their impaired secretory function.
- 7) **Single-cell RNA sequencing revealed that *FKBP2* deletion disrupts the trajectory of cell differentiation towards the β -cell phenotype,** and the population becomes more heterogeneous, with a higher proportion of α -cells.
- 8) **HDAC9 is synthesized in cells with *FKBP2* deletion and its location in the cell is mainly in the cell nucleus.** Increased protein synthesis correlates with a decrease in the synthesis of a key marker of β -cell maturity, indicating that HDAC9 acts as a repressor of differentiation and maturation of these cells.
- 9) **Pharmacological intervention inhibiting HDAC9 function partially restores the synthesis of β -cell maturity markers,** indicating the potential application of this strategy to reverse β -cell differentiation disorders under ER stress conditions.
- 10) **Induction of ER stress using DTT confirmed that FKBP2 has a protective effect on β -cells.**

11. Oświadczenia doktoranta o wkładzie w powstanie publikacji

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Autor: Edyta K. Urbaniak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu był równorzędny z Anną Jędrzejak i Jadwigą Waśko i obejmował:

- opracowanie koncepcji artykułu,
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu,
- napisanie poszczególnych części tekstu,
- przegląd i uporządkowanie literatury w formie tabel.

 Signed by /
Podpisano przez:
Edyta Karolina
Urbaniak
Date / Data:
2025-09-06 10:28
.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Edyta K. Urbaniak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- projektowanie i realizacja eksperymentów, w tym wygenerowanie linii hPSC z nokautem *FKBP2* oraz nadekspresją tego genu,
- różnicowanie w kierunku trzustkowym,
- analiza scRNA-seq komórek β typu dzikiego i nokautowych w dwóch punktach czasowych,
- akwizycja i analiza danych,
- przygotowanie rycin,
- pisanie manuskryptu,
- pozyskanie finansowania.



Signed by /
Podpisano przez:

Edyta Karolina
Urbaniak

Date / Data:
2025-09-06 10:28

Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes.

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Autor: Edyta K. Urbaniak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- analize formalna,
- pozyskanie finansowania,
- zebranie badań/eksperymentów,
- wizualizacja, pisanie – oryginalny szkic,
- pisanie – przegląd i redakcja.


Signed by /
Podpisano przez:
Edyta Karolina
Urbaniak
Date / Data:
2025-09-06 10:29
.....
Podpis autora

Authorship statements of PhD candidate

Declaration of Contribution to the Publication

Article title: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Author: Edyta K. Urbaniak

I hereby declare that my contribution to the article was equal to that of Anna Jedrzejak and Jadwiga Wasko and included:

- developing the concept of the article,
- preparing the first draft of the manuscript,
- writing specific sections of the text,
- reviewing and organizing the literature in tabular form.



Signed by /
Podpisano przez:

Edyta Karolina
Urbaniak

Date / Data:
2025-09-06 10:50

.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes*

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Author: Edyta K. Urbaniak

I declare that my contribution to the article included:

- formal analysis,
- funding acquisition,
- investigation,
- visualization,
- writing – original draft,
- writing – review and editing.



Signed by /
Podpisano przez:

Edyta Karolina
Urbaniak

Date / Data:
2025-09-06 10:49

.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Edyta K. Urbaniak

I declare that my contribution to the article included:

- design and execution of experiments, including generation of hPSC lines with FKBP2 knockout and overexpression,
- pancreatic differentiation,
- scRNA-seq analysis of wild-type and knockout β cells at two time points,
- data acquisition and analysis,
- figure preparation,
- manuscript writing,
- funding acquisition.



Signed by /
Podpisano przez:

Edyta Karolina
Urbaniak

Date / Data:
2025-09-06 10:49

.....
Author's signature

12. Oświadczenia współautorów o wkładzie w powstanie publikacji

Oświadczenie o wkładzie w publikację

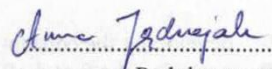
Tytuł artykułu: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Autor: Anna P. Jędrzejak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu był równorzędny z Urbaniak Edytą i Jadwigą Waśko i obejmował:

- opracowanie koncepcji artykułu,
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu,
- napisanie poszczególnych części tekstu,
- przegląd i uporządkowanie literatury w formie tabel.


Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Autor: Jadwiga A. Waško

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu był równorzędny z Edytą Urbaniak i Anną Jędrzejak i obejmował:

- opracowanie koncepcji artykułu,
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu,
- napisanie poszczególnych części tekstu,
- przegląd i uporządkowanie literatury w formie tabel.

01.09.2025 Jadwiga Waško

Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Autor: Natalia Ziojła

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

Opracowanie i uporządkowanie danych dotyczących receptorów oraz mechanizmów zakażenia, a także przygotowanie rycin zamieszczonych w artykule.



Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Autor: Prof. Malgorzata Borowiak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

Zainicjowanie przeglądu, nadzorowanie procesu przygotowania manuskryptu oraz jego przegląd merytoryczny.

.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

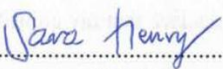
Tytuł artykułu: Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes.

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Autor: Sara Henry

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- pisanie – oryginalny szkic,
- pisanie – przegląd i redakcja


.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

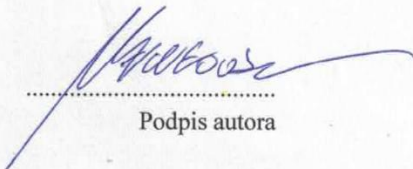
Tytuł artykułu: Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes.

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Autor: Maciej Łałowski

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- konceptualizacja,
- pozyskanie finansowania,
- nadzór,
- pisanie – oryginalny szkic,
- pisanie – przegląd i redakcja.



.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes.

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Autor: Prof. Małgorzata Borowiak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- konceptualizację,
- pozyskanie finansowania,
- nadzór,
- pisanie – oryginalny szkic,
- pisanie – przegląd i redakcja.



Podpis autora

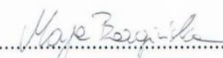
Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Maja Bagińska

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- udział w realizacji eksperymentów, w tym różnicowanie w kierunku trzustkowym linii komórkowej z delecją *FKBP2*,
- wygenerowanie linii hPSC z indukowalnym nokautem *FKBP2* (iKO).


.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Wojciech J. Szlachcic

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- analizę danych
- przygotowanie rycin


.....
Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Małgorzata Grabowska

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- wykonanie cytometrii przepływowej
- udział w różnicowaniu w kierunku trzustkowym.

Małgorzata Grabowska

Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Ekaterina Shcheglova

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- analizę pseudoczasu w scRNA-seq

Ekaterina Shcheglova

.....
Podpis autora

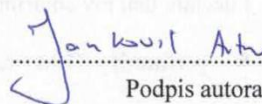
Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: Artur Jankowski

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- wykonanie analizy TEM (mikroskopia elektronowa).


Podpis autora

Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: prof. Michał Marzec

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- konceptualizacja,
- analiza danych,
- redakcja manuskryptu.


.....
Podpis autora

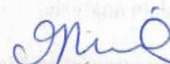
Oświadczenie o wkładzie w publikację

Tytuł artykułu: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9

Autor: prof. Malgorzata Borowiak

Oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu obejmował:

- konceptualizacja,
- projektowanie eksperymentów,
- analiza danych,
- pisanie manuskryptu oraz pozyskanie finansowania.



Podpis autora

Authorship statements of co-authors of the article

Declaration of Contribution to the Publication

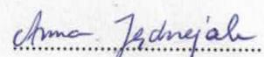
Article title: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Author: Anna P. Jedrzejak

I hereby declare that my contribution to the article was equal to that of Urbaniak Edyta and Jadwiga Wasko and included:

- developing the concept of the article,
- preparing the first draft of the manuscript,
- writing specific sections of the text,
- reviewing and organizing the literature in tabular form.


Author's signature

Declaration of Contribution to the Publication

Article title: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Author: Jadwiga A. Waško

I hereby declare that my contribution to the article was equal to that of Edyta Urbaniak and Anna Jędrzejak and included:

- developing the concept of the article,
- preparing the first draft of the manuscript,
- writing specific sections of the text,
- reviewing and organizing the literature in tabular form.

01.09.2023 Jadwiga Waško
.....
Author's signature

Declaration of Contribution to the Publication

Article title: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Author: Prof. Malgorzata Borowiak

I hereby declare that my contribution to the article included:

Initiating the review, supervising the manuscript preparation process, and conducting its substantive review.


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

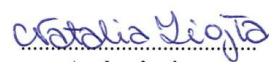
Article title: *Diabetes and SARS-CoV-2 – Is There a Mutual Connection?*

DOI: 10.3389/fcell.2022.913305

Author: Natalia Ziojła

I hereby declare that my contribution to the article included:

Compilation and organization of data concerning receptors and infection mechanisms, as well as the preparation of the figures included in the article.


Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes*

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Author: Sara Henry

I declare that my contribution to the article included:

- writing – original draft,
- writing – review and editing.

Sara Henry

Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

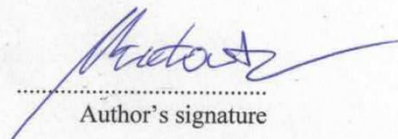
Article title: *Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes*

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Author: Maciej Łałowski

I declare that my contribution to the article included:

- conceptualization,
- funding acquisition,
- supervision,
- writing – original draft,
- writing – review and editing.



Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

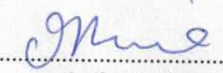
Article title: *Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes*

DOI: 10.3389/fcell.2025.1502469

Author: Prof. Małgorzata Borowiak

I declare that my contribution to the article included:

- conceptualization,
- funding acquisition,
- supervision,
- writing – original draft,
- writing – review and editing.


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Maja Bagińska

I declare that my contribution to the article included:

- participation in experimental execution, including pancreatic differentiation of KO lines,
- generation of hPSC lines with inducible knockout *FKBP2* (iKO).


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Wojciech J. Szlachet

I declare that my contribution to the article included:

- data analysis,
- figure preparation.


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Małgorzata Grabowska

I declare that my contribution to the article included:

- performing flow cytometry,
- participation in pancreatic differentiation.

Małgorzata Grabowska
.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Ekaterina Shcheglova

I declare that my contribution to the article included:

- pseudotime analysis in scRNA-seq

Ekaterina Shcheglova

.....
Author's signature

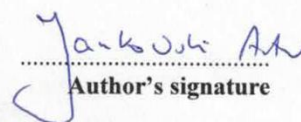
Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC*

Author: Artur Jankowski

I declare that my contribution to the article included:

- performing TEM (transmission electron microscopy) analysis.


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Prof. Michał Marzec

I declare that my contribution to the article included:

- conceptualization,
- data analysis,
- manuscript editing.


.....
Author's signature

Statement of Contribution to the Publication

Article title: *ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9*

Author: Prof. Malgorzata Borowiak

I declare that my contribution to the article included:

- conceptualization,
- experimental design,
- data analysis,
- manuscript writing and funding acquisition.



Author's signature

13. Finansowanie

Praca ta została dofinansowana przez grant Narodowego Centrum Nauki OPUS (UMO-2020/37/B/NZ3/01917 i UMO-2020/39/B/NZ3/01408 dla M. B.), Fundację na rzecz Nauki Polskiej i program UE TEAM (POIR.04.04.00-00-20C5/16-00) dla M. B. oraz grant Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM (UMO-2023/49/N/NZ3/01436) dla E. U.

Funding

This work was supported by the Polish National Science Center grant OPUS, (UMO-2020/37/B/NZ3/01917 and UMO-2020/39/B/NZ3/01408 to M. B.), Foundation for Polish Science and EU TEAM Program (POIR.04.04.00-00-20C5/16-00) to M. B., and the Polish National Science Center grant PRELUDIUM (UMO-2023/49/N/NZ3/01436) to E. U.

14. Publikacje niezwiązane z tematyką rozprawy, stanowiące część dorobku naukowego

Ziojła NM*, Socha M*, Guerra MC, Szwedziak P, Kowalska K, Lin J, Takahashi K, Bhatt S, Novak I, Jedrzejak AP, Urbaniak EK, Wasko JA, Borowiak M. ETVs dictate hPSC differentiation by tuning biophysical properties. *Nat Commun.* 2025;16:1999. doi: 10.1038/s41467-025-56591-6. (Praca oryginalna)⁹⁹.

Hoefner C, Bryde TH, Pihl C, Tiedemann SN, Bresson SE, Hotiana HA, Khilji MS, Santos TD, Puglia M, Pisano P, Majewska M, Durzynska J, Klindt K, Klusek J, Perone MJ, Bucki R, Hägglund PM, Gourdon PE, Gotfryd K, Urbaniak E, Borowiak M, Wierer M, MacDonald PE, Mandrup-Poulsen T, Marzec MT. FK506-Binding Protein 2 Participates in Proinsulin Folding. *Biomolecules.* 2023 Jan 11;13(1):152. doi: 10.3390/biom13010152. PMID: 36671537; PMCID: PMC9855983. (Praca oryginalna)³⁸.

Research articles not related to the topic of the dissertation, constituting a part of scientific portfolio

Ziojła NM*, Socha M*, Guerra MC, Szwedziak P, Kowalska K, Lin J, Takahashi K, Bhatt S, Novak I, Jedrzejak AP, Urbaniak EK, Wasko JA, Borowiak M. ETVs dictate hPSC differentiation by tuning biophysical properties. *Nat Commun.* 2025;16:1999. doi: 10.1038/s41467-025-56591-6. (Original article)⁹⁹.

Hoefner C, Bryde TH, Pihl C, Tiedemann SN, Bresson SE, Hotiana HA, Khilji MS, Santos TD, Puglia M, Pisano P, Majewska M, Durzynska J, Klindt K, Klusek J, Perone MJ, Bucki R, Hägglund PM, Gourdon PE, Gotfryd K, Urbaniak E, Borowiak M, Wierer M, MacDonald PE, Mandrup-Poulsen T, Marzec MT. FK506-Binding Protein 2 Participates in Proinsulin Folding. *Biomolecules.* 2023 Jan 11;13(1):152. doi: 10.3390/biom13010152. PMID: 36671537; PMCID: PMC9855983. (Original article)³⁸.

15. Podziękowania

Z całego serca dziękuję mojej Promotorce, Pani Profesor Małgorzacie Borowiak, za opiekę, cenne wskazówki i ogromne wsparcie, bez których ta rozprawa nigdy by nie powstała.

Dziękuję również Panu Profesorowi Maciejowi Łałowskiemu za wnikliwe przeczytanie mojej pracy, pomoc w szlifowaniu języka i wszystkie podpowiedzi, które uczyniły tekst lepszym.

Szczególne podziękowania składam mojej przyjaciółce, Dorocie Kiżewskiej, która zawsze była obok i mogłam na nią liczyć w każdej chwili.

Największe słowa wdzięczności należą się moim Najbliższym – za cierpliwość, wyrozumiałość i ogromne wsparcie, szczególnie wtedy, gdy obowiązki związane z doktoratem pochłaniały cały mój czas i siły.

Dziękuję także wszystkim z Borowiak Lab – zarówno obecnym, jak i tym, którzy byli częścią zespołu wcześniej – za świetną atmosferę, pomoc i koleżeństwo, które bardzo cenie.

Acknowledgements

I would like to express my heartfelt gratitude to my Supervisor, Professor Małgorzata Borowiak, for her guidance, valuable advice, and immense support, without which this dissertation would never have been completed.

I am also grateful to Professor Maciej Łałowski for carefully reviewing my dissertation, helping me refine its language, and providing all the suggestions that made the text better.

My special thanks go to my friend, Dorota Kiżewska, who was always by my side and on whom I could rely at any moment.

I owe my deepest gratitude to my Family for their patience, understanding, and tremendous support, especially during those times when my doctoral work consumed all my time and energy.

I would also like to thank everyone from the Borowiak Lab – both current and former members – for the wonderful atmosphere, help, and camaraderie that I deeply appreciate.

16. Referencje/References

1. Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E. & Gregg, E. W. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia* **62**, 3–16 (2019).
2. Atkinson, M. A., von Herrath, M., Powers, A. C. & Clare-Salzler, M. Current Concepts on the Pathogenesis of Type 1 Diabetes—Considerations for Attempts to Prevent and Reverse the Disease. *Diabetes Care* **38**, 979–988 (2015).
3. Lu, X. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **9**, 262 (2024).
4. Zalecenia Kliniczne Dotyczące Postępowania U Osób Z Cukrzycą 2023 | PDF. *Scribd* <https://www.scribd.com/document/690045208/Zalecenia-Kliniczne-Dotycz%C4%85ce-Post%C4%99powania-u-Osob-z-Cukrzyc%C4%85-2023>.
5. Wydawnictwa NIZP-PZH. *NIZP PZH - PIB* <https://www.pzh.gov.pl/category/wydawnictwa-nizp-pzh/>.
6. Cho, N. H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **138**, 271–281 (2018).
7. Wysham, C. & Shubrook, J. Beta-cell failure in type 2 diabetes: mechanisms, markers, and clinical implications. *Postgrad. Med.* **132**, 676–686 (2020).
8. Zavarzadeh, P. G. *et al.* Exploring proinsulin proteostasis: insights into beta cell health and diabetes. *Front. Mol. Biosci.* **12**, (2025).
9. Li, J. *et al.* LONP1 regulation of mitochondrial protein folding provides insight into beta cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Metab.* **7**, 1570–1592 (2025).
10. Ceriello, A. & Motz, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 816–823 (2004).
11. Eizirik, D. L., Pasquali, L. & Cnop, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 349–362 (2020).
12. Oyadomari, S., Araki, E. & Mori, M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **7**, 335–345 (2002).
13. Miyake, M. *et al.* Identification of an endoplasmic reticulum proteostasis modulator that enhances insulin production in pancreatic β cells. *Cell Chem. Biol.* **29**, 996–1009.e9 (2022).
14. Rezania, A. *et al.* Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1121–1133 (2014).
15. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
16. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 115–130 (2017).
17. Rowe, R. G. & Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 377–388 (2019).
18. Mahaddalkar, P. U. *et al.* Generation of pancreatic β cells from CD177+ anterior definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1061–1072 (2020).
19. Högberg, N. J., Augsornworawat, P., Maxwell, K. G., Velazco-Cruz, L. & Millman, J. R. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **38**, 460–470 (2020).
20. Pagliuca, F. W. *et al.* Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* **159**, 428–439 (2014).

21. Blaszczyk, K. *et al.* SPOCK2 controls the proliferation and function of immature pancreatic β -cells through MMP2. *Exp. Mol. Med.* **57**, 131–150 (2025).
22. Russ, H. A. *et al.* Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J.* **34**, 1759–1772 (2015).
23. Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. & Guillemot, F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1607–1611 (2000).
24. Jennings, R. E., Berry, A. A., Strutt, J. P., Gerrard, D. T. & Hanley, N. A. Human pancreas development. *Development* **142**, 3126–3137 (2015).
25. Sun, X., Wang, L., Obayomi, S. M. B. & Wei, Z. Epigenetic Regulation of β Cell Identity and Dysfunction. *Front. Endocrinol.* **12**, (2021).
26. Rutter, G. A. & Hodson, D. J. Beta cell connectivity in pancreatic islets: a type 2 diabetes target? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 453–467 (2015).
27. Miranda, J. G. *et al.* Dynamic changes in β -cell $[Ca^{2+}]$ regulate NFAT activation, gene transcription, and islet gap junction communication. *Mol. Metab.* **57**, 101430 (2021).
28. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–484 (2005).
29. Kawada, Y. *et al.* Histone deacetylase regulates insulin signaling via two pathways in pancreatic β cells. *PLoS ONE* **12**, e0184435 (2017).
30. Lenoir, O. *et al.* Specific Control of Pancreatic Endocrine β - and δ -Cell Mass by Class IIa Histone Deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. *Diabetes* **60**, 2861–2871 (2011).
31. Liu, M., Wright, J., Guo, H., Xiong, Y. & Arvan, P. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam. Horm.* **95**, 35–62 (2014).
32. Urbaniak, E., Henry, S., Lalowski, M. & Borowiak, M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.* **13**, (2025).
33. Hartley, T. *et al.* Endoplasmic reticulum stress response in an INS-1 pancreatic beta-cell line with inducible expression of a folding-deficient proinsulin. *BMC Cell Biol.* **11**, 59 (2010).
34. Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C. J. & Butler, P. C. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr. Rev.* **29**, 303–316 (2008).
35. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
36. Lenghel, A., Gheorghita, A. M., Vacaru, A. M. & Vacaru, A.-M. What Is the Sweetest UPR Flavor for the β -cell? That Is the Question. *Front. Endocrinol.* **11**, 614123 (2021).
37. Grimmond, S. *et al.* Exclusion of the 13-kDa rapamycin binding protein gene (FKBP2) as a candidate gene for multiple endocrine neoplasia type 1. *Hum. Genet.* **95**, 455–458 (1995).
38. Hoefner, C. *et al.* FK506-Binding Protein 2 Participates in Proinsulin Folding. *Biomolecules* **13**, 152 (2023).
39. Nair, G. G. *et al.* Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. *Nat. Cell Biol.* **21**, 263–274 (2019).
40. Jedrzejak, A. P., Urbaniak, E. K., Wasko, J. A., Ziojla, N. & Borowiak, M. Diabetes and SARS-CoV-2–Is There a Mutual Connection? *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, (2022).
41. Daly, J. L. *et al.* Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* **370**, 861–865 (2020).
42. Cantuti-Castelvetri, L. *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856–860 (2020).
43. Li, Y.-C., Bai, W.-Z. & Hashikawa, T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* **92**, 552–555 (2020).

44. Arnaout, R. *et al.* SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2020.06.02.131144 (2020) doi:10.1101/2020.06.02.131144.
45. Sonnberg, S., Webby, R. J. & Webster, R. G. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Res.* **178**, 63–77 (2013).
46. Luo, R. *et al.* A novel missense variant in ACAA1 contributes to early-onset Alzheimer's disease, impairs lysosomal function, and facilitates amyloid- β pathology and cognitive decline. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 325 (2021).
47. Amin, S., Aktar, S., Rahman, M. M. & Chowdhury, M. M. H. NLRP3 inflammasome activation in COVID-19: an interlink between risk factors and disease severity. *Microbes Infect.* **24**, 104913 (2022).
48. Blondin, D. P. *et al.* Human Brown Adipocyte Thermogenesis Is Driven by β 2-AR Stimulation. *Cell Metab.* **32**, 287-300.e7 (2020).
49. Back, S. H. & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 767–793 (2012).
50. Oakes, S. A. & Papa, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu. Rev. Pathol.* **10**, 173–194 (2015).
51. Palomino, D. C. T. & Marti, L. C. Chemokines and immunity. *Einstein* **13**, 469–473 (2015).
52. Sanmiguel, J. C., Olaru, F., Li, J., Mohr, E. & Jensen, L. E. Interleukin-1 regulates keratinocyte expression of T cell targeting chemokines through interleukin-1 receptor associated kinase-1 (IRAK1) dependent and independent pathways. *Cell. Signal.* **21**, 685–694 (2009).
53. Latorre-Muro, P. *et al.* A cold-stress-inducible PERK/OGT axis controls TOM70-assisted mitochondrial protein import and cristae formation. *Cell Metab.* **33**, 598-614.e7 (2021).
54. Yang, J. *et al.* Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **94**, 91–95 (2020).
55. Kusmartseva, I. *et al.* Expression of SARS-CoV-2 Entry Factors in the Pancreas of Normal Organ Donors and Individuals with COVID-19. *Cell Metab.* **32**, 1041-1051.e6 (2020).
56. Wu, C.-T. *et al.* SARS-CoV-2 infects human pancreatic β cells and elicits β cell impairment. *Cell Metab.* **33**, 1565-1576.e5 (2021).
57. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2255–2273 (2020).
58. Tang, S., Werner-Seidler, A., Torok, M., Mackinnon, A. J. & Christensen, H. The relationship between screen time and mental health in young people: A systematic review of longitudinal studies. *Clin. Psychol. Rev.* **86**, 102021 (2021).
59. Zhang, S. *et al.* Bidirectional Association Between Cardiovascular Disease and Lung Cancer in a Prospective Cohort Study. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **19**, 80–93 (2024).
60. Infection with SARS-CoV-2 can cause pancreatic impairment | Signal Transduction and Targeted Therapy. <https://www.nature.com/articles/s41392-024-01796-2>.
61. Donath, A. *et al.* Improved annotation of protein-coding genes boundaries in metazoan mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* **47**, 10543–10552 (2019).
62. Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 630–642 (2013).
63. Fonseca, S. G., Gromada, J. & Urano, F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **22**, 266–274 (2011).
64. Sun, J. *et al.* Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Mol. Aspects Med.* **42**, 105–118 (2015).
65. Mayer, J. P., Zhang, F. & DiMarchi, R. D. Insulin structure and function. *Biopolymers* **88**, 687–713 (2007).

66. Liu, M. *et al.* Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes. Metab.* **20 Suppl 2**, 28–50 (2018).
67. Araki, K. & Nagata, K. Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 32705–32712 (2011).
68. Kanemura, S. *et al.* Characterization of the endoplasmic reticulum-resident peroxidases GPx7 and GPx8 shows the higher oxidative activity of GPx7 and its linkage to oxidative protein folding. *J. Biol. Chem.* **295**, 12772–12785 (2020).
69. Saito, K., Maeda, M. & Katada, T. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, 75 (2017).
70. Gomez-Navarro, N. & Miller, E. Protein sorting at the ER-Golgi interface. *J. Cell Biol.* **215**, 769–778 (2016).
71. Liu, M., Wright, J., Guo, H., Xiong, Y. & Arvan, P. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam. Horm.* **95**, 35–62 (2014).
72. Barg, S., Eliasson, L., Renström, E. & Rorsman, P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S74-82 (2002).
73. Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C. & MacDonald, M. J. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* **53**, 1019–1032 (2010).
74. Mueckler, M. *et al.* A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 17765–17767 (1994).
75. Haataja, L. *et al.* Distinct states of proinsulin misfolding in MIDY. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **78**, 6017–6031 (2021).
76. Hasnain, S. Z., Prins, J. B. & McGuckin, M. A. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *J. Mol. Endocrinol.* **56**, R33-54 (2016).
77. Stanciu, G. D. *et al.* Link Between Diabetes and Alzheimer's Disease due to the Shared Amyloid Aggregation and Deposition Involving both Neurodegenerative Changes and Neurovascular Damages. *J. Clin. Med.* **9**, 1713 (2020).
78. Marhfour, I. *et al.* Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **55**, 2417–2420 (2012).
79. Ghassemifard, L. *et al.* Cell Therapies and Gene Therapy for Diabetes: Current Progress. *Curr. Diabetes Rev.* **21**, e130524229899 (2025).
80. Kim, D.-S. *et al.* GRP94 is an IGF-1R chaperone and regulates beta cell death in diabetes. *Cell Death Dis.* **15**, 374 (2024).
81. Schuit, F. C., Kiekens, R. & Pipeleers, D. G. Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1182–1187 (1991).
82. Urbaniak, E. *et al.* ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β -cell differentiation via NFAT and HDAC9. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2025.09.01.672695> (2025).
83. van Gurp, L. *et al.* Generation of human islet cell type-specific identity genesets. *Nat. Commun.* **13**, 2020 (2022).
84. Velazco-Cruz, L. *et al.* Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Rep.* **12**, 351–365 (2019).
85. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–2232 (2003).
86. Keller, M. P. *et al.* The Transcription Factor Nfatc2 Regulates β -Cell Proliferation and Genes Associated with Type 2 Diabetes in Mouse and Human Islets. *PLoS Genet.* **12**, e1006466 (2016).
87. Darden, C. M. *et al.* Calcineurin/NFATc2 and PI3K/AKT signaling maintains β -cell identity and function during metabolic and inflammatory stress. *iScience* **25**, 104125 (2022).

88. Avrahami, D. *et al.* Aging-Dependent Demethylation of Regulatory Elements Correlates with Chromatin State and Improved β Cell Function. *Cell Metab.* **22**, 619–632 (2015).
89. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* **150**, 1223–1234 (2012).
90. Sachdeva, M. M. *et al.* Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19090–19095 (2009).
91. Sachdeva, M. M. & Stoffers, D. A. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **23**, 747–758 (2009).
92. Shrestha, S. *et al.* Elevated glucose represses lysosomal and mTOR-related genes in renal epithelial cells composed of progenitor CD133+ cells. *PLoS ONE* **16**, e0248241 (2021).
93. Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345 (2011).
94. Baron, M. *et al.* A Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Pancreas Reveals Inter- and Intra-cell Population Structure. *Cell Syst.* **3**, 346-360.e4 (2016).
95. Xin, Y. *et al.* RNA Sequencing of Single Human Islet Cells Reveals Type 2 Diabetes Genes. *Cell Metab.* **24**, 608–615 (2016).
96. Brackhan, M. *et al.* Isotope-labeled amyloid- β does not transmit to the brain in a prion-like manner after peripheral administration. *EMBO Rep.* **23**, e54405 (2022).
97. Arruda, A. P. *et al.* Chronic enrichment of hepatic ER-mitochondria contact sites leads to calcium dependent mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* **20**, 1427–1435 (2014).
98. Yang, S., Zhou, R., Zhang, C., He, S. & Su, Z. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 571554 (2020).
99. Ziojła, N. M. *et al.* ETVs dictate hPSC differentiation by tuning biophysical properties. *Nat. Commun.* **16**, 1999 (2025).

17. Załączniki/ Attachments

1. Publikacja 1/ Article 1

Jedrzejak AP, **Urbaniak EK**, Wasko JA, Ziojla N, Borowiak M. Diabetes and SARS-CoV-2- Is There a Mutual Connection? *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 13;10:913305. doi: 10.3389/fcell.2022.913305. PMID: 35769263; PMCID: PMC9234398.

<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.913305/full>

2. Publikacja 2/ Article 2

Urbaniak E, Henry S, Lalowski M, Borowiak M. Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2025 Feb 20;13:1502469. doi: 10.3389/fcell.2025.1502469. PMID: 40052150; PMCID: PMC11882602.

<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2025.1502469/full>

3. Publikacja 3/ Article 3 *

Urbaniak E, Baginska M, Szlachcic WJ, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec MT, and Borowiak M. *bioRxiv* 2025. ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9. doi: 10.1101/2025.09.01.672695.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.09.01.672695v1>

* Pozostałe tabele uzupełniające są dostępne pod poniższym linkiem./ The remaining supplementary tables are available at the following link.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.09.01.672695v1.supplementary-material>